

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA**

**E. A. P. DE QUÍMICA**

**Obtención de los ácidos grasos del aceite de la *Plukenetia  
volubilis* L. "Sacha Inchi" para la utilización en la  
industria y estudio fitoquímico cualitativo de la almendra**

**TESIS**

**para obtener el título profesional de Químico**

**AUTORA**

**Nancy Pariona Mendoza**

**ASESORA**

**Juana María Huamán Malla**

**Lima – Perú**

**2008**

A mis padres Marta y Juan,  
por su apoyo incondicional,  
paciencia y confianza.

A mis hermanos por su  
apoyo, comprensión y  
paciencia.

## **Agradecimientos**

- ❖ A la Quim. Juana María Huamán Malla y Quim. Marco Vicente Guerrero Aquino por su apoyo incondicional y por el aporte científico en la elaboración de la presente tesis.
- ❖ Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química e Ing. Química.
- ❖ A la Unidad de Servicios y Análisis Químicos (USAQ) de la UNMSM: María Angélica Rodríguez Best, Percy, Raquel, Cynthia, Yanny y Artur.
- ❖ Quim. Julio Santiago por su aporte científico.
- ❖ Jorge Luis Rodríguez por su apoyo incondicional.
- ❖ Víctor José Noé por su apoyo para concluir este trabajo.
- ❖ A todos mis amigos por su apoyo incondicional.

## ÍNDICE

	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	01
II. OBJETIVOS	03
III. PRINCIPIOS TEÓRICOS	04
3.1 Lípidos	
3.1.1 Clasificación de lípidos	04
3.1.2 Ceras, aceites y grasas	06
3.1.3 Los ácidos grasos	06
3.2 Sacha inchi ( <i>Plukenetia volubilis linneo</i> )	
3.2.1 Aspecto botánico	14
3.2.2 Características del cultivo	15
3.2.3 El aceite de sachá inchi	16
3.2.4 Mercados potenciales	19
3.3 Preparación de los ácidos grasos	19
3.3.1 Análisis de los ácidos grasos	21
3.3.2 Aplicación industrial de los ácidos grasos	22
3.3.3 Innovación en la preparación de los ácidos grasos	24
IV. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Materiales	
4.1.1 Materia prima	27
4.1.2 Reactivos	27
4.1.3 Materiales de laboratorio	28
4.1.4 Equipos	28

4.2 Procedimiento experimental	
4.2.1 Determinación de las condiciones óptimas de trabajo	
para la separación de los ácidos grasos	29
4.2.1.1 Determinación del peso de KOH	29
4.2.1.2 Determinación del volumen de cloruro de	
metileno y temperatura	30
4.2.1.3 Extracción de los ácidos grasos y separación	
de los ácidos grasos saturados	31
4.2.2 Determinación del índice de yodo	32
4.2.3 Análisis de los ácidos grasos	33
4.2.4 Análisis fitoquímico	34
V. EJEMPLOS DE CÁLCULOS	37
VI. RESULTADOS	39
6.1.- Reacciones	43
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. RECOMENDACIONES	50
X. BIBLIOGRAFÍA	51
XI. ANEXO	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO		PÁGINA
01	Vitamina A en la que se detalla las unidades de isopreno	05
02	Hidrólisis de una grasa	06
03	Ácido palmítico (C16:0)	08
04	Ácido esteárico (C18:0)	08
05	Ácido oleico (C18:1 <sup>9</sup> )	09
06	Ácido linoleico (C18:2 <sup>9,12</sup> )	09
07	Ácido linolénico (C18:3 <sup>9,12,15</sup> ) (Ácido alfa linolénico)	09
08	Ácido trans-oleico (C18:1 <sup>9t</sup> )	10
09	Ácido <i>cis</i> -oleico (C18:1 <sup>9c</sup> )	10

## ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO		PÁGINA
01	Composición aproximada de grasas y aceites de diferentes fuentes	07
02	Ácidos grasos insaturados	11
03	Composición aproximada de algunas grasas y aceites [1]	17
04	Contenido de nutrientes de semillas oleaginosas	18
05	Contenido de proteínas de semillas oleaginosas	18
06	Determinación del peso de KOH	39
07	Determinación de volumen de solvente y temperatura	39
08	Condiciones óptimas de trabajo para separar los ácidos grasos	40
09	Valores obtenidos en la extracción de los ácidos grasos y separación de los ácidos grasos saturados	40
10	Valores de la composición de los ácidos grasos anexo 9 – anexo 12	41
11	Composición de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados	41
12	Valores promedio del índice de yodo	41
13	Determinación de saponinas	42
14	Determinación de cumarinas	42
15	Determinación de alcaloides	42

## ÍNDICE DE ANEXO

NÚMERO	PÁGINA
01	Figura N°10:
	Equipo de Schlenk para la saponificación en atmosfera inerte 54
01	Figura N° 11: Muestra saponificada 54
02	Figura N°12: Precipitación de los ácidos grasos saturados en acetona 55
02	Figura N°13: Recuperación del solvente 55
03	Figura N° 14: Mezcla de ácidos grasos 56
04	Espectro FTIR muestra de aceite del “sacha inchi” sin tratar (M1) 57
05	Espectro FTIR solución de mezcla de ácidos grasos extraídos (M2) 58
06	Comparación de espectros FTIR de M1 y M2 59
07	Espectros IR de estándares: Proporcionados por Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. 60
08	Cromatograma y perfil de los ácidos grasos (Aceite de pescado) 61
09	Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M1 (Aceite sachá Inchi sin tratar) 63
10	Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M2 (Mezcla de ácidos grasos) 65
11	Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M3 (Precipitado de los ácidos grasos) 67
12	Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M4 (Filtrado de los ácidos grasos) 69



## ABREVIATURAS

- EPA: Ácido eicosapentaenoico
- DHA: Ácido docosahexaenoico
- AGP: Ácidos grasos poliinsaturados
- AGE: Ácidos grasos esenciales
- PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados
- PGI<sub>3</sub>: Prostaglandinas
- TxA<sub>3</sub>: Tromboxanos
- HDL: Colesterol bueno
- LDL: Colesterol malo
- TAG: Triacilgliceroles
- PL: Fosfolípidos

## I.- INTRODUCCIÓN

La *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” es una planta de la Amazonía peruana conocida por los nativos desde hace miles de años, fue usado por los pre-incas y los incas como lo testimonian cerámicos encontrados en tumbas (huacos Mochica - Chimú).

Muchos ácidos grasos, particularmente los ácidos grasos poliinsaturados, son difíciles de sintetizar y se pueden obtener solamente por la extracción de las grasas naturales o los aceites. Muchos de estos ácidos grasos insaturados son conocidos por presentar características terapéuticas para prevenir alteraciones cardiovasculares, reacciones antiinflamatorias, artritis y coagulación sanguínea.

Es una necesidad obtener los ácidos grasos insaturados en forma pura y en mayor cantidad por sus múltiples aplicaciones en la industria. Esto es muy difícil de obtener, puesto que la fuente principal de los ácidos grasos insaturados son las grasas, algas marinas, leche humana y los aceites vegetales como el aceite de linaza; aceites de animales marinos: caballa, salmón, atún, sardina.

En el presente trabajo se obtienen los ácidos grasos insaturados del aceite de “sacha inchi” con un bajo contenido de ácidos grasos saturados. Esta mezcla de ácidos grasos obtenidos, son ampliamente utilizados en la industria como aditivos en la alimentación humana, alimentos balanceados para diferentes especies de animales, productos cosméticos y biológicos, pinturas, barnices y en forma de sal se usan como pesticidas.

El Perú actualmente exporta el aceite de “sacha inchi”, al exportar esta mezcla de ácidos grasos extraídos del aceite beneficiará mucho a la economía de nuestro país, ya que este producto natural se podrá comercializar en forma diferente.

Igualmente se realizó un estudio fitoquímico cualitativo de la almendra del “sacha inchi” con la finalidad de determinar la presencia de metabolitos secundarios, encontrándose en la almendra presencia significativa de alcaloides, saponinas y una cantidad moderada de cumarinas fijas.

Al aceite del “sacha inchi” virgen extraído por el método de extrusión por la empresa “**Agroindustrias Amazónicas**” adquirido en las tiendas Wong el 27/02/07 cuyo Lote es A 26 y la semilla de “sacha inchi” es cultivada en la región de San Martín, se le sometió a un proceso de extracción de sus ácidos grasos por medio de una técnica descrita sólo para alimentos de origen marino, con la finalidad de obtener una mezcla de ácidos grasos que sea posible usarlos para diferentes aplicaciones industriales.

El dato obtenido del índice de yodo en el aceite de “sacha inchi” inicial (M1) es 192 y el final (M4) es 196; el cual nos indica que con el procedimiento realizado se produjo la extracción de ácidos grasos saturados, aumentando el contenido de ácidos grasos insaturados como se demuestra al aumentar el valor del índice de yodo.

Los resultados de la determinación de la mezcla de ácidos grasos obtenida y analizada por CG nos muestran que el contenido inicial de ácidos grasos saturados en el aceite de “sacha inchi” fue de 7,24 % y el final de 2,95 % disminuyendo en un 4,29 % el contenido de los ácidos grasos saturados y con respecto al contenido de los ácidos grasos insaturados inicial fue de 83,74% y final de 88,05% aumentando en un 4,31 %, lo que confirma la extracción de solo ácidos grasos saturados.

## **II.- OBJETIVOS**

### **General:**

- Obtener una mezcla con mayor contenido de ácidos grasos insaturados del aceite del “sacha inchi”.
- Conocer los metabolitos secundarios presentes en la almendra de “sacha inchi” utilizada para extraer el aceite.

### **Específico:**

- Utilizar una técnica novedosa descrita en la patente 6846942 de Estados Unidos aplicada para aceites de pescados.
- El procedimiento emplea una técnica por primera vez en un producto vegetal el aceite del “sacha inchi” el cual extrae los ácidos grasos saturados dando lugar a una mezcla con mayor contenido de ácidos grasos insaturados, que son importantes para la alimentación humana como suplementos, usados para alimentos balanceados de animales, para productos biológicos, cosméticos, pinturas y el uso de sus sales como pesticidas.
- Realizar la purificación de la mezcla de ácidos grasos obtenidos.
- La obtención de la mezcla de ácidos grasos del aceite de “sacha inchi” obtenida contribuirá a una mejor utilización de este producto natural con beneficios económicos para el país.
- Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios característicos de la almendra de “sacha inchi”.

### III.- PRINCIPIOS TEÓRICOS

#### 3.1.- LOS LÍPIDOS

Los lípidos son utilizados por los seres humanos desde épocas antiguas, fueron estudiados solamente en el siglo XIX por los científicos, probablemente porque son difíciles de separar e identificar.

Los lípidos son moléculas orgánicas que se encuentran en la naturaleza, aisladas de las células y tejidos por extracción con disolventes orgánicos no polares [1].

En un sentido más amplio, "lípidos" define sustancias como aceites, grasas y ceras que se pueden caracterizar por que [2]:

- Proviene de animales y plantas.
- Son insolubles o inmiscibles en agua pero solubles en solventes orgánicos tales como: cloroformo, éter, benceno y acetona.
- Está formado por grupos de cadenas largas de hidrocarburos puede también puede contener oxígeno, fósforo, nitrógeno y azufre.

##### 3.1.1.- CLASIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS

Los lípidos se clasifican en dos tipos generales: grasas y ceras, las cuales contienen ésteres y pueden ser hidrolizados. Los esteroides como el colesterol no son ésteres y no pueden ser hidrolizados.

**SAPONIFICACIÓN.-** Es una reacción típica de los ácidos grasos, con álcalis dando lugar a una sal de ácido graso, que se denomina jabón.

**a.- LÍPIDOS SAPONIFICABLES.-** Agrupan a los derivados por esterificación u otras modificaciones de los ácidos grasos y se sintetizan en los organismos a partir de la unión sucesiva de unidades de dos átomos de carbono. En este grupo se incluyen [3]:

#### A. Simples

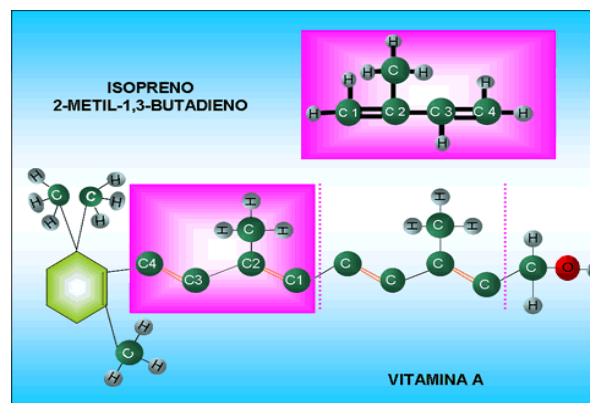
- Acilglicéridos (grasas)
- Céridos (ceras)

#### B. Complejos

- Fosfolípidos (lecitina y cefalina)
- Glucolípidos

**b.- LÍPIDOS INSAPONIFICABLES:** Se sintetizan a partir de una unidad básica de 5 átomos de carbono: el isopreno (figura 1). En este grupo de lípidos se incluyen:

- A. Terpenos: Retinoides, carotenoides, tocoferoles.
- B. Esteroides: Esteroles, sales y ácidos biliares, hormonas esteroideas.
- C. Prostaglandinas : Cuya molécula básica está constituida por 20 átomos de carbono que forman un anillo ciclopentano y dos cadenas alifáticas.



**Figura Nº 1:** Vitamina A en la que se detalla las unidades de isopreno.

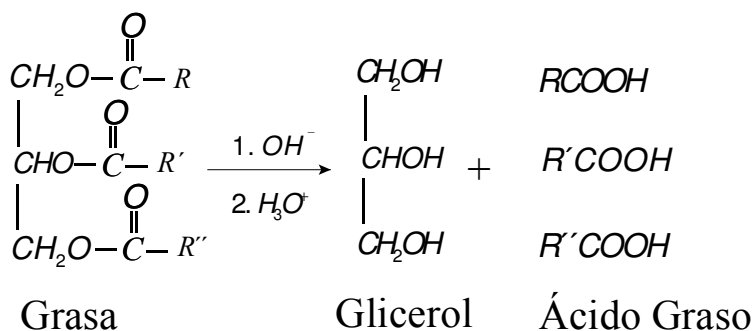
### 3.1.2.- CERAS, ACEITES y GRASAS

Las **ceras** [1] son mezclas de ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga con alcoholes que también poseen cadena larga. El ácido carboxílico usualmente tiene un número par de carbonos de 16 a 36, mientras el alcohol posee un número par de carbonos de 24 a 36.

Las **grasas** animales y los **aceites** vegetales son los lípidos que se encuentran en mayor abundancia en la naturaleza. Aunque parecen diferentes las grasas animales: mantequilla y manteca son sólidas, mientras que los aceites vegetales: maíz y cacahuete son líquidos, sus estructuras están estrechamente relacionadas.

Las **grasas** y los **aceites** son **triacilglicerol** (**TAG**, también llamados triglicéridos), triésteres del glicerol con tres ácidos carboxílicos de cadena larga [1].

La hidrólisis de una grasa o aceite con NaOH acuoso producen glicerol y tres ácidos grasos:



**Figura Nº2:** Hidrólisis de una grasa

### 3.1.3.- LOS ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga. Por lo general, contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 12 y 24. Ello se debe a que la síntesis biológica tiene lugar mediante la unión sucesiva de unidades de dos átomos de carbono. Sin embargo también existen

ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, que probablemente derivan de la metilación de un ácido graso de cadena par.

En la tabla 1 se lista la composición aproximada de grasas y aceites de diferentes fuentes [1].

Nombre	Carbonos	Estructura	Punto de Fusión (°C)
<b>Saturados</b>			
Láurico	12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44
Mirístico	14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	58
Palmítico	16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63
Esteárico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	70
Araquídico	20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	75
<b>Insaturados</b>			
Palmitoleico	16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}(\text{cis})$	32
Oleico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}(\text{cis})$	4
Ricinoleico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}(\text{cis})$	5
Linoleico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}(\text{cis,cis})$	-5
Araquidónico	20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}(\text{todo cis})$	-50

**Tabla Nº 1:** Composición aproximada de grasas y aceites de diferentes fuentes

**PROPIEDADES QUÍMICAS.-** Derivan por una parte, de la presencia de un grupo carboxilo y por otra parte de la existencia de una cadena hidrocarbonada. La coexistencia de ambos componentes en la misma molécula, convierte a los ácidos grasos en moléculas carácter débilmente anfipático (el grupo  $\text{COOH}$  es hidrofílico y la cadena hidrocarbonada es hidrofóbica). El carácter anfipático es tanto mayor cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada. La solubilidad en agua decrece a medida que aumenta la longitud de la cadena.

El grupo carboxílico de la molécula convierte al ácido graso en un ácido débil. Los ácidos grasos participan en las reacciones químicas propias del grupo  $\text{COOH}$ : esterificación con grupos  $\text{OH}$  alcohólicos, formación de enlaces amida con grupos  $\text{NH}_2$ , formación de sales (jabones), etc. El grupo  $\text{COOH}$  es capaz de formar puentes de hidrógeno, de forma que los puntos de fusión de los ácidos grasos son mayores que los de los hidrocarburos correspondientes.



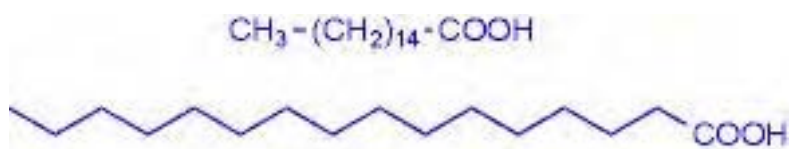
Según la naturaleza de la cadena hidrocarbonada se clasifican en:

### a.- ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

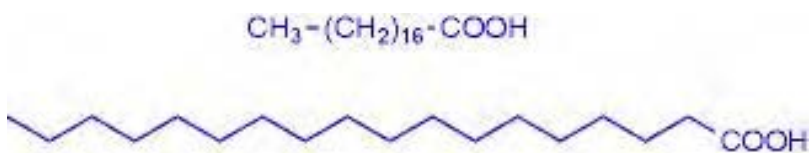
Su comportamiento químico se caracteriza por ser muy poco reactivo. Por lo general, contienen un número par de átomos de carbono. Con frecuencia se usa la nomenclatura común.

Los ácidos grasos saturados de 10 átomos de carbonos son líquidos a temperatura ambiente y parcialmente solubles en agua. A partir de 12 carbonos, son sólidos y prácticamente insolubles en agua.

En estado sólido, los ácidos grasos saturados adoptan la conformación alternada todo-anti dándole un máximo de simetría al cristal, por eso los puntos de fusión son elevados. El punto de fusión aumenta con la longitud de la cadena.



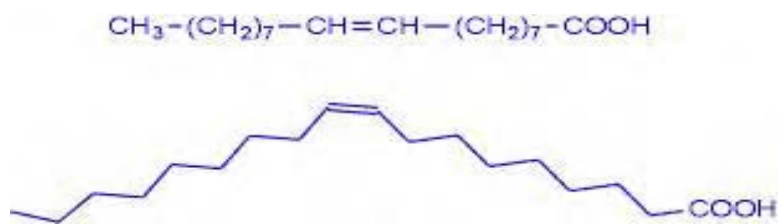
**Figura N° 3:** Ácido palmítico (C16:0)



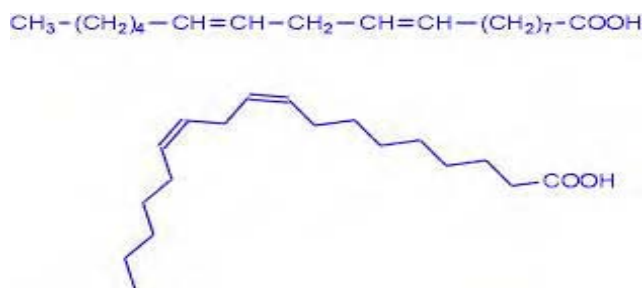
**Figura N° 4:** Ácido Esteárico (C18:0)

### b.- ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

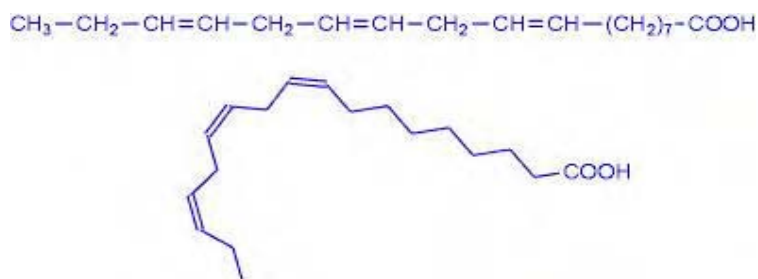
Con mucha frecuencia, aparecen insaturaciones en los ácidos grasos en forma de dobles enlaces en la misma cadena, estos no aparecen conjugados (alternados), sino cada tres átomos de carbono.



**Figura Nº 5:** Ácido oleico (C18:<sup>9</sup>)



**Figura Nº 6:** Ácido linoleico (C18:2<sup>9,12</sup>)

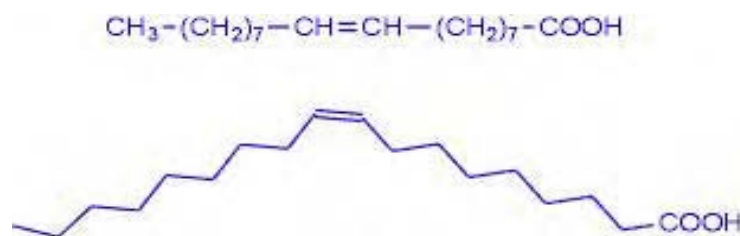


**Figura Nº 7:** Ácido linolénico (C18:3<sup>9,12,15</sup>) (Ácido alfa - linolénico)

Por lo general, las insaturaciones de los ácidos grasos son del tipo cis. Esto hace que la disposición de la molécula sea angulada, con el vértice en la insaturación. Esta angulación hace que el punto de fusión de los ácidos insaturados sean más bajos que los de sus homólogos saturados. Los dobles enlaces en trans distorsionan poco la simetría cristalina, que es muy parecida a la de los ácidos grasos saturados.



**Figura Nº 8:** Ácido trans-oleico (C18:1<sup>9t</sup>)



**Figura Nº 9:** Ácido *cis*-oleico (C18:1 <sup>9c</sup>)

Algunos ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolénico y araquidónico) no pueden ser sintetizados por los animales superiores (incluido el hombre) y como su función biológica es fundamental, deben ser suministrados en la dieta. Por este motivo reciben el nombre de ácidos grasos esenciales.

Estas consideraciones están implícitas en relación a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta: [4-5].

- 1) Reemplazan a los ácidos grasos saturados.
- 2) Disminuyen la síntesis de ácidos grasos saturados.
- 3) Disminuyen los niveles circulantes de lipoproteínas.
- 4) Regulan la síntesis de eicosanoides.

Altos niveles de lipoproteínas en circulación pueden ser un factor de riesgo de varias enfermedades y la excesiva formación de eicosanoides puede ser un elemento común a muchas enfermedades [4-5].

### **REACCIONES DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS:**

Los ácidos grasos insaturados manifiestan las propiedades inherentes al doble enlace:

- Reaccionan fácilmente con ácido sulfúrico para dar sulfonatos, que se emplean frecuentemente como detergentes domésticos.
- Los dobles enlaces pueden adicionar hidrógeno. La hidrogenación catalítica (completa) de los ácidos grasos insaturados constituye la base de la

transformación industrial de aceites en grasas sólidas (la margarina es el resultado de la hidrogenación de aceites vegetales).

- Los dobles enlaces pueden autooxidarse con el oxígeno del aire. Es una reacción espontánea en la que se producen radicales peróxido y radicales libres, muy reactivos, que provocan en conjunto el fenómeno de enranciamiento de las grasas, que resulta la formación de una compleja mezcla de compuestos de olor desagradable.

<b>Ácidos grasos insaturados</b>		
NOMBRE COMÚN	NOMBRE IUPAC	Abreviatura
Palmitoleico	9-cis Hexadecenoico	C16:1
Oleico	9-cis Octadecenoico	C18:1
Linoleico	9, 12 todo-cis Octadecadienoico	C18:2
Linolénico	9,12,15 todo-cis Octadecatrienoico	C18:3
Araquidónico	5,8,11,14 todo-cis Eicosatetraenoico	C20:4

**Tabla Nº 2:** Ácidos grasos insaturados

### **c.- ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES**

Existen dos ácidos grasos poliinsaturados (AGP) que el cuerpo no puede producir: el ácido linoleico y el ácido alfa - linolénico. Deben obtenerse de la dieta y se conocen como ácidos grasos esenciales.

Los ácidos grasos esenciales (AGE) [6] reciben esta denominación puesto que:

a) No pueden ser sintetizados por el organismo.

b) Cumplen un importante rol metabólico.

Una vez en el cuerpo, se pueden convertir en otros AGP, como el ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA).

En el cuerpo, los AGP son importantes para: mantener las membranas de todas las células, producir las prostaglandinas que regulan muchos procesos corporales como la inflamación y coagulación de la sangre.

### **- ÁCIDOS GRASOS OMEGA - 3:**

Los ácidos grasos omega - 3 son ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados y en algunas fuentes vegetales como las semillas de lino, nueces, mostaza, pepas de calabaza, soja, hortalizas de hoja verde y cereales.

Se ha demostrado experimentalmente que el consumo de grandes cantidades de omega - 3 aumenta considerablemente el tiempo de coagulación de la sangre, lo cual explica por qué en comunidades que consumen muchos alimentos con omega - 3 (esquimales, japoneses, etc.) la incidencia de enfermedades cardiovasculares es sumamente baja.

### **- Omega - 3 de cadena corta**

Los que están presentes en los aceites vegetales tienen 18 átomos de carbono. el alfa - linolénico de cadena corta se encuentra en aceites como la soja y canola.

### **- Omega - 3 de cadena larga**

Los que están presentes en los aceites marinos tienen más de 18 átomos de carbono. Los ácidos grasos omega - 3 de cadena larga incluyen al "alfa - linolénico" y sus derivados los ácidos grasos "Eicosapentaenoico" (EPA) y "Docosahexaenoico" (DHA). Ambos se encuentran en pescados principalmente en aquellos más grasos como jurel, salmón, bacalao y sardina.

### **- Funciones de los omega - 3**

- Ayudan en las enfermedades con reacciones fisiológicas y fisiopatológicas tales como alteraciones cardiovasculares, prevalencia de diabetes tipo 2,

trombosis, hipersensibilidad (artritis reumatoidea, alergias) y coagulación sanguínea.

- Su consumo actúa mejorando la función inmunológica, disminuyendo la agregación de las plaquetas, reduciendo la respuesta inflamatoria en enfermedades y mejorando la dilatación de las arterias [7].

- Su ingesta baja los triglicéridos [7].

- Su consumo eleva el colesterol bueno o HDL (protegiendo al corazón y las arterias)

- Estudios más recientes han determinado que la suplementación del omega - 3 podría ser provechosa contra muchas enfermedades inflamatorias [8-12].

- **ÁCIDOS GRASOS OMEGA - 6:**

Son ácidos grasos poliinsaturados que se encuentra en los aceites vegetales de: girasol, maíz, soja, calabaza, pepita de uva y germen de trigo.

- **Funciones de los Omega - 6**

- Los ácidos grasos omega - 6 son considerados esenciales con amplios efectos biológicos positivos para la salud, como el alivio de la inflamación relacionada con la artritis reumatoide y los síntomas del síndrome premenstrual [14]. Los efectos biológicos del omega - 6 interactúan con los efectos de los ácidos grasos omega - 3.

- Un consumo adecuado de omega - 6 baja el nivel del colesterol total y del colesterol LDL (colesterol malo).

### **3.2.- SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* Linneo)**

Es una planta de la Amazonía peruana conocida por los nativos desde hace miles de años, la utilizaron los pre-incas y los incas como lo testimonian cerámicos encontrados en tumbas (huacos Mochica-Chimú).

La especie *Plukenetia volubilis* L. es conocida de acuerdo al idioma o lugar con los siguientes nombres: “sacha inchi”, “sacha maní”, “maní del inca”, “maní del monte”, “inca peanuts”

#### **3.2.1- ASPECTO BOTÁNICO:**

*Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, es una oleaginosa que pertenece a la familia Euphorbiaceae comprende plantas anuales de importancia ornamental, medicinal, alimentaria e industrial, que se caracterizan principalmente por la presencia de una sustancia lechosa, tipo látex y frutos tricapsulares. Abarca alrededor de 1280 géneros con 8000 especies aproximadamente [15].

El género *Plukenetia* ha sido reportado en Malasia, Nueva Guinea, Borneo, México, etc. (Biblioteca Conmemorativa Orton, 1987). El número de especies reportadas en América Tropical varía de 7 a 12 [16]. En América del Sur, la presencia de *Plukenetia volubilis* L., ha sido registrada en la Amazonía Peruana, Bolivia y las Indias Occidentales [17].

En nuestro país se encuentra en Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa, San Martín, Cuenca del Ucayali (Pucallpa, Contamana y Requena), Putumayo y alrededores de Iquitos y Caballococha.

En San Martín se le encuentra a lo largo de la Cuenca del Huallaga hasta Yurimaguas, en el Alto Mayo, Bajo Mayo, Sub Cuenca del Cumbaza y en áreas del sector Lamas-Shanusi.

## **Clasificación botánica**

La clasificación botánica (Ayala, s.a. y Field Museum. s.a.) de la planta es la siguiente:

Nombre común: Sacha inchi

Orden: *Euphorbiales*

Familia: *Euphorbiaceae*

Género: *Plukenetia*

Especie: *volubilis* Linneo

Nombre Científico: *Plukenetia volubilis* Linneo.

### **3.2.2.- CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO:**

**Altitud:** 80 a 1700 msnm. [18]

**Hojas:** Alternas acorazadas [18-19].

**Es Hermafrodita:** Con flores pequeñas en racimo y flores masculinas en la base de cada racimo.

**Frutos:** Son cápsulas de 3 - 5 cm de diámetro, dehiscentes de color verde intenso, cuando maduran son de color marrón oscuro [18-19].

Usualmente presentan 4 lóbulos, pero algunos frutos presentan de 5 - 7 lóbulos. Las Semillas se encuentran dentro de los lóbulos de las cápsulas.

**Miden** de 15 – 20 mm de ancho, por 7 - 8 mm de espesor.

**Peso de Semillas:** Varía de 0,8 - 1,4 g.

Las **semillas** contienen de 49 - 54% de aceite, en las semillas se encuentran los cotiledones a manera de almendras, cubiertas de una fina película blanquecina que cubre a la almendra que es la materia prima para la extracción del aceite.

**Composición de la semilla:** 33 - 35% de cáscara y 65 - 67% de almendra.



### **Clima y Suelo:**

Planta hermafrodita, de rápido crecimiento, desde 100 msnm en la Selva Baja a 1500 msnm en Selva Alta, requiere agua permanente y abundante luz para la fotosíntesis, en sombra intensa la floración disminuye. A humedad relativa de 78% y temperatura media de 26 °C, las plantas están libres de enfermedades. Hay crecimiento vegetativo y fructificación continua, durante todo el año. En verano el número de cápsulas se incrementa y baja en invierno [18-9].

El “sacha inchi” se adapta a diferentes tipos de suelo, su rusticidad le permite crecer en suelos con alta concentración de aluminio. En suelos aluviales su producción alcanza mayor nivel.

Para mayor desarrollo y producción, el “sacha inchi” necesita terrenos con buen drenaje, a nivel superficial y profundo.

La semilla del “sacha inchi” supera en mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados y en menor porcentaje de grasas saturadas, a todas las semillas oleaginosas utilizadas en el mundo, para la producción de aceites para consumo humano y en calidad de proteína para la producción de harinas proteicas.

La primera mención científica del “sacha inchi” fue hecha en 1980 a consecuencia de los análisis de contenido graso y proteico realizados por la Universidad de Cornell en USA, los que demostraron que las semillas del “sacha inchi” tienen alto contenido de proteínas (33%) y aceite (49%).

### **3.2.3.- EL ACEITE DE “SACHA INCHI”**

En comparación a los aceites de todas las semillas oleaginosas utilizadas en el mundo, para consumo humano, el “sacha inchi” es el más rico en ácidos grasos insaturados, llega hasta 93,6%.

El promedio de los ácidos grasos poliinsaturados está compuesto de:

- 48,60% de ácido graso esencial alfa linolénico Omega - 3
- 36,80% de ácido graso esencial linoleico Omega - 6 y
- 8,28% de ácido oleico Omega - 9

Presenta bajo contenido de ácidos grasos saturados 6,39% en promedio, 3,85% de palmítico y 2,54% de esteárico.

**LOS ACEITES OMEGA:** Esta compuesto por los ácidos grasos oleico “omega - 9”, linoleico “omega - 6” y el alfa linolénico “omega - 3”, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA).

	Ácidos grasos saturados (%)				Ácidos grasos insaturados (%)		
	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>
Fuente	Láurico	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Oleico	Ricinoleico	Linoleico
<b>Grasa animal</b>							
Grasa de cerdo	-	1	25	50	50	-	6
Mantequilla	2	10	25	10	25	-	5
Grasa humana	1	3	25	8	46	-	10
Grasa de ballena	-	8	12	3	35	-	10
<b>Aceite Vegetal</b>							
Coco	50	18	8	2	6	-	1
Maíz	-	1	10	4	35	-	45
Oliva	-	1	5	5	80	-	7
Cacahuete	-	-	7	5	60	-	20
Linaza	-	-	5	3	20	-	20
Ricino	-	-	-	1	8	85	4

**Tabla 3:** Composición aproximada de algunas grasas y aceites [1].

CONTENIDO DE NUTRIENTES DE SEMILLAS OLEAGINOSAS

SEMILLAS NUTRIENTES	SACHA INCHI	SOYA	MAIZ	MANI	GIRASOL	ALGODÓN	PALMA	OLIVA
PROTEINAS	29	28		23	24	32.9		
ACEITE TOTAL +	54	19		45	48	16		
PALMITICO Saturado -	3.85	10.5	11	12	7.5	18.4	45	13
ESTEARICO Saturado -	2.54	3.2	2	2.2	5.3	2.4	4	3
OLEICO Monoinsaturado	8.28	22.3	28	43.3	29.3	18.7	40	71
POLINSATURADOS:								
LINOLEICO $\Omega_6$	36.8	54.5	58	36.8	57.9	57.5	10	10
LINOLÉNICO $\Omega_3$	48.61	8.3	1	0.0	0.0	0.5	0	1

Fuente: HAZEN&STOVESAND, 1980 - Duclos, 1980 - Agroindustrias Amazónicas, 2001

Tabla 4: Contenido de nutrientes de semillas oleaginosas.

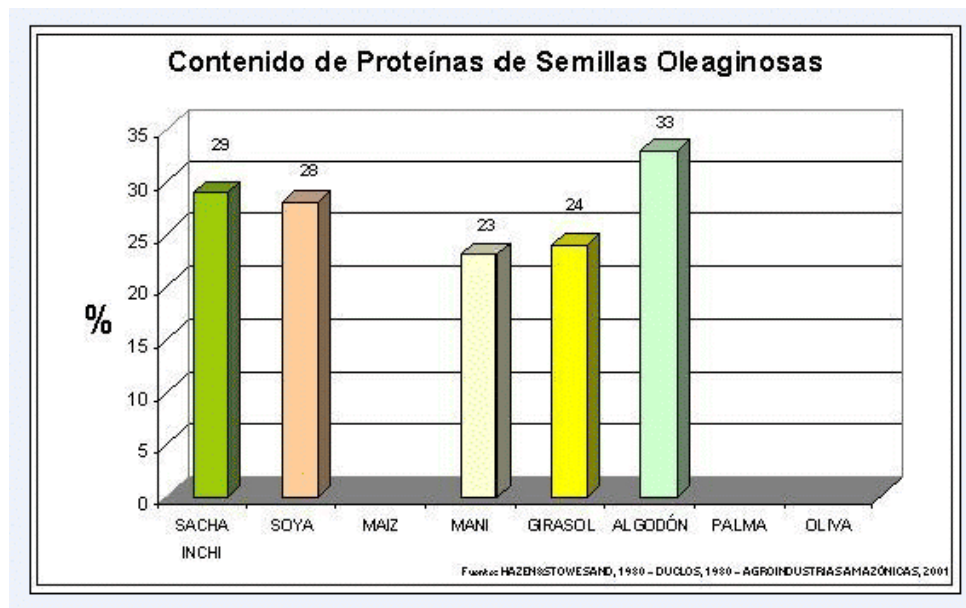


Tabla 5: Contenido de proteínas de semillas oleaginosas

### **3.2.4.- MERCADOS POTENCIALES**

En el mundo actual debido a la sobre producción de comida rápida con elevados índices de grasas saturadas, la población viene sufriendo de obesidad y aumento de sus índices de colesterol. La tendencia actual de los consumidores es la de prevenir y luchar contra el colesterol; por lo que la producción y comercialización de los aceites omega esta siendo incrementada en los mercados: Mercado Nacional (Perú), Japón, Unión Europea y Estados Unidos.

### **3.3.- PREPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS**

Las etapas para la preparación de los ácidos grasos comprenden [20]:

#### **A.- Hidrólisis alcalina de glicéridos**

El proceso de hidrólisis alcalina de glicéridos implica la producción del jabón, comúnmente llamada saponificación. Descubierta y descrito detalladamente por Chevreul en 1823, el proceso todavía funciona casi en su forma original. En su famoso trabajo, Hilditch (1956) recomienda que para la mayoría de las grasas naturales se saponifiquen 100 g de la grasa con una solución de 30 g de KOH en 500 mL del alcohol (95-100%), hirviendo bajo reflujo durante 3 horas, seguido por la destilación de la mayor parte de alcohol.

#### **B.- Separación de la materia insaponificable**

Después de la saponificación, se destila la mitad del alcohol empleando una bomba de vacío, el residuo es diluido con agua y la materia insaponificable (hidrocarburos, tocoferoles, esteroides, etc.) se extrae con un solvente orgánico como por ejemplo éter dietílico o éter de petróleo.

## **C.- Recuperación de los ácidos grasos de los jabones**

Los ácidos grasos son liberados por la adición del ácido mineral, generalmente un exceso del 10% de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico. Cuando los ácidos de cadena corta están presentes, el alcohol es removido por acidificación bajo vacío con la adición de suficiente agua para mantener los jabones en solución.

## **D.- Purificación de los ácidos grasos**

Después de su separación, los ácidos grasos se pueden purificar por uno de estos procedimientos:

### **D.1.- Destilación**

La destilación fraccionada a presiones reducidas fue utilizada inicialmente para separar las mezclas de los ácidos grasos y ésteres derivados de las grasas naturales.

### **D.2.- Método de solubilidad de la sal**

Los ácidos grasos saturados y no saturados forman sales con los iones metálicos, que son solubles en agua, solventes orgánicos, la cual varía con la naturaleza del ion metálico, la longitud de cadena, grado de no saturación y otras características de los radicales ácidos.

El método mas utilizado de separación metálica de la sal depende de la solubilidad diferenciada de las sales del plomo o de los jabones de ácidos grasos en éter. Este método fue introducido por Gusserow CA en 1828 (*Arch Pharm* 1828, 27, 153) y mejorado más adelante por Varrentrapp F (*Arch Chem Leibigs* 1840, 35, 196).

Una de las modificaciones más importantes fue introducida por Twitchell (*Ind Eng Chem* 1921, 13, 806) que substituyó el etanol por el éter dietílico. El precipitado ó los ácidos grasos saturados son regenerados de las sales insolubles de plomo hirviendo con HCl diluido. Después de refrescarse, la torta

de los ácidos grasos sólidos se separan y la capa acuosa se extrae con éter. En el estudio de este método se concluye que: La separación completa entre los ácidos saturados y ácidos grasos insaturados es imposible.

### **D.3.- Cristalización a baja temperatura**

La cristalización de los ácidos grasos y ésteres con solventes a bajas temperaturas fue introducida en el año 1930. Esta técnica fue utilizada extensamente para la separación de los ácidos grasos, monoésteres, separación de glicéridos y otras sustancias del lípido. JB Brown aplicó por primera vez la cristalización a baja temperatura para la separación de ácidos grasos [28].

Encontrándose los primeros reportes sobre la separación de los ácidos grasos hechos en 1937 *Brown JB et al* [22]. Las tentativas previas fueron hechas (*Holde D et al., Ber 1901, 34, 2402*) en la separación de los glicéridos del aceite de oliva.

Hilditch utilizó extensivamente este método para fraccionar los glicéridos de grasas naturales. Las varias modificaciones fueron hechas con respecto al solvente, concentración de grasas o glicéridos y temperaturas. La cristalización a baja temperatura se ha dado cerca de 25 años y como una alternativa al método de la sal del plomo [20].

### **3.3.1.- ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS**

#### **CROMATOGRAFÍA GAS – LÍQUIDO (GLC)**

Fue descubierta en 1950 y revolucionado el análisis de ácidos grasos. Esta técnica es frecuentemente usada para estos compuestos [23]. Es aplicable a muestras biológicas que contienen estos lípidos, con una longitud de cadena en un rango de C 14 a C 24.

El análisis del GLC de los ácidos grasos se realiza después de su conversión apolar a los derivados del éster metílico. Las columnas con fases polares se

utilizan, como fase inmóvil del glicol de polietileno (Carbowax), para cubrir la columna capilar. La mayoría de columnas disponibles en el comercio está cubierta con las fases enlazadas o inmovilizadas en la pared de la columna de la silicona. Esta tecnología conduce a una gran durabilidad con una estabilidad termal fuerte.

### **3.3.2.- APLICACIÓN INDUSTRIAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS**

- El producto obtenido de ácidos grasos o convertido en derivados, se puede utilizar en nutrición, cosmética, biológico y/o aplicaciones para comida de animal [24].
- Se utilizan en diversas formulaciones: bebidas alimenticias, yogures, helados, queso, mantequilla, etc. [24]
- El ácido linoleico conjugado tiene efecto de mejorar el metabolismo de los lípidos, prevención de la obesidad, prevención y tratamiento de la hipertensión [31].
- Los ácidos grasos se utilizan como materia prima para diversos síntesis de ésteres [25].
- Los ácidos grasos son ampliamente utilizados como materia prima intermedia de los alimentos, tales como monoglicéridos y diglicéridos, así como aditivo, intermedio y materia prima para otros tipos de productos industriales [25].
- Muchos de estos ácidos grasos insaturados son conocidos por sus características terapéuticas [24].
- En realidad, los ácidos grasos alfa ácido linolénico familia que tienen un papel fundamental en el desarrollo y función del cerebro, la retina , así como la formación de  $\text{PGI}_3$  y  $\text{TxA}_3$ , que son factores de suma importancia para la lucha contra la agregación plaquetaria [26].
- Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que se encuentran en la membrana de fosfolípidos (PL) son precursores de la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos que se unen a las proteínas específicas - G receptor acoplamiento y señal celular respuestas fisiológicas a la inflamación, presión arterial, dolor, vasodilatación y fiebre [27].
- En consecuencia los PUFAs, sus derivados y análogos son importantes para la nutrición y objetivos farmacológicos [28].

- Los microencapsulados de los ácidos grasos en la demanda de productos como suplementos para agregar a los alimentos. La encapsulación protege los productos de ácidos grasos frente a la oxidación y evita el desarrollo de olor [29].
- Los microencapsulados pueden contener los ácidos grasos insaturados, mezcla de los ácidos grasos, compuestos de ácidos grasos y en particular los ácidos grasos omega - 3 ó omega - 6 [29].
- Uno de los principales usos es en el campo de pinturas y barnices. Los aceites de los triglicéridos de los ácidos grasos conjugados se conocen como aceites de sequía. Los aceites de sequía tienen valor debido a su capacidad de polimerizarse o “secar” después de que se hayan aplicado a la superficie de forma resistente, adherente y películas resistentes a la abrasión [24].
- Los ácidos grasos son los componentes básicos para diversas composiciones que van desde lubricantes, polímeros, solventes, cosméticos y similares.
- Además, los ácidos linoleicos conjugado están disponibles comercialmente en forma de suplementos dietéticos de cápsula o tableta en muchos casos [31].
- En vista de estos y otros beneficios para la salud, se convierte en un interés general para proporcionar PUFAs como un aditivo funcional y oralmente ingestible, tales como alimentos, suplementos alimenticios, bebidas, etc. [32].
- Recientemente, las sales de ácidos grasos, sobre todo las sales de sodio y potasio, se han utilizado comercialmente como plaguicidas.. Estas sales de ácidos grasos son eficaces pesticidas naturales que no tienen efectos conocidos a largo plazo en el medio ambiente. Actualmente se comercializan bajo la marca Safer Insecticidal Soap [33].



### **3.3.3.- INNOVACIONES EN LA PREPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS**

#### **Rubin, en la patente británica No. 2.148.713:**

Se describe un proceso en el cual los dobles enlaces de los ácidos grasos no saturados, en una mezcla de ácidos grasos, son yodados, seguido por la saponificación del aceite yodado, la extracción de los ácidos grasos de la mezcla de la saponificación, metilación de los ácidos grasos yodados, separación de los ácidos grasos por cromatografía de columna y finalmente la desyodización de las fracciones deseadas. Este proceso permite la resolución excelente de los ácidos grasos bajo una eventual cromatografía de columna y protege los ácidos grasos contra la oxidación durante el proceso. Esta técnica es utilizada para separar EPA de una fuente natural, tal como del aceite del hígado de bacalao, de una producción de sobre el 90% con una pureza de 96-100 %. Se ha encontrado, sin embargo, que una cantidad substancial de la conversión cis-trans ocurre en el curso de este proceso, de modo que el producto obtenido no sea totalmente EPA en su forma cis. Además, el yodo no está en la lista de los materiales GRAS.

#### **Cleary, Michael T. (Elmhurst, IL, US) Kulprathipanja, Santi (Hoffman Estates, IL, US) U.S Patente No. 4.353.839:**

Un proceso para separar los ácidos grasos insaturados de una mezcla de ácidos grasos saturados, este proceso abarca entrar en contacto con una mezcla donde las condiciones de adsorción son con un adsorbente, un polímero reticulado insoluble hidrofóbico de poliestireno, fijando de tal modo selectivamente el ácido graso saturado por adsorción para el cual el adsorbente es selectivo. El ácido graso saturado fijado por adsorción será recuperado preferiblemente del adsorbente por la desorción con un material desorbente.

**Fujita y otros., en la patente No. 4.377.526 de los E.E.U.U:**

Esta patente divulga un método para purificar EPA. Una mezcla de los ácidos grasos que contienen EPA se trata con úrea para quitar los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos con baja insaturación. La solución resultante entonces se sujeta a la destilación fraccionada para obtener productos con mayor contenido de EPA. La destilación fraccionada, sin embargo, requiere una temperatura por lo menos de 180 °C durante por lo menos 40 minutos. La mejor pureza que puede ser obtenida con este método se muestra en ejemplos con un 92.9%. Además, se ha descubierto que una cantidad sustancial del EPA ha sido producida con este método, en algunos casos un 20%, tiene cierto grado de la conversión cis-trans. Cualquier cantidad de la forma trans de EPA es estrictamente indeseable para el uso farmacéutico o de comidas.

**Teshima y otros, en Bulletin of the Japanase Society of Scientific Fisheries, 44 (8) 927 (1978):**

Se describen un método para aislar EPA y DHA del aceite del hígado del calamar por saponificación con hidróxido de potasio etanólico, extrayendo los ácidos grasos con éter y metilándolo. El éster metílico crudo del ácido graso es purificado por cromatografía de columna con Silica Gel 60, y entonces el EPA es separado del DHA por cromatografía de columna en una mezcla del nitrato de plata y gel de silicona. El problema con esta técnica es que hay a menudo rastros de plata sueltos en el producto final, que es extremadamente indeseable en un alimento o farmacéutico para el consumo humano. Además, las cantidades muy altas de solvente son necesarias para eluir la columna cromatografía.

**Rubin, en U.S. Patente No. 4.792.418:**

Describe un proceso para obtener los ácidos grasos poliinsaturados puros tales como EPA, DHA y sus ésteres, sin la degradación de estos. Este proceso implica primero el hidrolizar los triglicéridos de la fuente de aceite bajo condiciones suaves, como una lipasa, quitando el material no saponificable

lavándose con el solvente orgánico, tratándolo con úrea para quitar ácidos grasos saturados y monoinsaturados para formar un complejo de úrea con ácidos grasos saturados y monoinsaturados, disolviendo el remanente en un solvente orgánico, preferiblemente acetona, refrescando lentamente y fraccionalmente quitando el material solidificado.

**Rubin, David., en la patente 6846942 de los E.E.U.U:**

Según la presente invención, el aceite de pescado se saponifica con una base al cual se añade una cantidad pequeña de etanol para empezar la reacción. La mezcla es agitada bajo nitrógeno. Luego un solvente como cloruro de metileno se agrega y se agita vigorosamente. La mezcla se vierte en una pera de separación. La fase del cloruro de metileno se retira para eliminar la materia insaponificable.

Los ácidos grasos libres son obtenidos de sus sales del sodio agregando un ácido como el ácido acético. Los ácidos grasos saturados son eliminados agregando un solvente tal como éter dietílico o acetona, se refrigera la mezcla para solidificar los ácidos grasos saturados y facilitar su retiro.

Para obtener los ácidos grasos omega - 3, se agrega una base como hidróxido de sodio en etanol. Después de la refrigeración a - 20°C, los sólidos formados son removidos dejando en la solución substancialmente los ácidos grasos omega. La acetona es evaporada y recuperada. Se añade agua y ácido acético al 50% para convertir las sales de sodio a ácidos grasos libres.

Se usa sal de magnesio para separar los ácidos grasos utilizando la diferencia de solubilidad a diferentes temperaturas.

## IV.- PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1.- MATERIALES

#### 4.1.1.- MATERIA PRIMA

En el presente estudio se utilizó el aceite de “sacha inchi” virgen extraído por el método de extrusión por la empresa “**Agroindustrias Amazónicas**” adquirido en las tiendas Wong el 27/02/07 cuyo Lote es A 26 y cuya semilla de “sacha inchi” es cultivada en la región de San Martín.

#### 4.1.2.- REACTIVOS

#### MARCA

➤ Hidróxido de potasio Qp	Mallinckrodt
➤ Cloruro de metileno Qp	Merck
➤ Ácido acético ACS	J.T. Barker
➤ Acetona ACS	J.T. Barker
➤ Hidróxido de sodio ACS	J.T. Barker
➤ Etanol absoluto Qp	Puriquin reagent
➤ Acetato de magnesio Qp	Merck
➤ Cloruro de sodio Qp	Mallinckrodt
➤ Ácido sulfúrico concentrado ACS	J.T. Barker
➤ Anhídrido acético ACS	J.T. Barker
➤ Ácido acético ACS	J.T. Barker
➤ Cloroformo ACS	J.T. Barker
➤ Ácido clorhídrico concentrado ACS	J.T. Barker
➤ Nitrato de Bismuto Qp	Movilab
➤ Ácido nítrico ACS	J.T. Barker
➤ Yodo sublimado ACS	LBH Chemical Product
➤ Cloruro de mercurio ACS	J.T. Barker
➤ Carbonato de sodio Qp	Merck
➤ Reactivo de Wijs Qp	Merck
➤ Tiosulfato de sodio pentahidratado ACS	J.T. Barker
➤ Yoduro de potasio ACS	J.T. Barker
➤ Almidón ACS	LBH Chemical Product

#### **4.1.3.- MATERIALES DE LABORATORIO**

- Vasos precipitados
- Probetas
- Pipetas
- Pera de separación
- Espátulas
- Baguetas
- Magnetos
- Balón de 3 bocas
- Llave Schlenk
- Lunas de reloj
- Embudos
- Soporte universal
- Pinzas
- Nuez
- Bureta

#### **4.1.4.- EQUIPOS**

- Balanza Acculab, capacidad máxima 120 g x 0,01 g
- Balanza Ohaus Scout SC 2020/3E0, capacidad máxima 200 g x 0,01 g
- Equipo de Schlenk
- Lámpara U.V. Mineralight Lap MultiBand UV - 254/365nm, Modelo:UVGL - 25
- Espectrofotómetro Infrarrojo (Espectrofotómetro FT-IR, Marca: Nicolet, Modelo: Impact 410).
- Cromatógrafo de gases Agilent modelo 6850
- Bomba de vacío ABM Greiffenberg Antriebstechnik GmbH Marktredwitz
- Rotavapor R - 3000

## **4.2.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:**

### **4.2.1.- DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO PARA LA SEPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS [36]:**

**4.2.1.1.- DETERMINACIÓN DEL PESO DE KOH:** El objetivo es saponificar el aceite, utilizando una adecuada cantidad de KOH, que pueda separar los ácidos grasos, para lo cual se realizaron las siguientes pruebas:

Para cada prueba se emplea 40 g de aceite de “sacha inchi”.

**1.-** Se pesa 10 g de KOH en un vaso de precipitado y se prepara una solución saturada, se realiza la saponificación durante 1h a temperatura de 26 °C. Se forma una masa sólida de color amarillo, la cual dificulta la extracción de la materia insaponificable con 20 mL de cloruro de metileno.

**2.-** Se pesa 15 g de KOH en un vaso de precipitado y se disuelve en 200 mL de agua destilada, se realiza la saponificación durante 1h a temperatura de 26 °C. Se aprecian dos fases, se dificulta la extracción de la materia insaponificable con 20 mL de cloruro de metileno.

**3.-** Se pesa 25 g de KOH en un vaso de precipitado y se disuelve en 200 mL de agua destilada, se realiza la saponificación durante 4h a temperatura de 26 °C. Se observa dos fases, con 20 mL de cloruro de metileno. No se forma las sales de potasio.

**4.-** Se pesa 50 g de KOH en un vaso de precipitado y se disuelve en 100 mL de agua destilada, se realiza la saponificación durante 1h a temperatura de 26 °C. Se agrega 20 mL cloruro de metileno, obteniendo una sola fase homogénea de color crema.

#### **4.2.1.2.- DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE CLORURO DE METILENO Y TEMPERATURA:**

Para cada prueba se emplea 40 g de aceite de “sacha inchi”.

**1.-** Se coloca 40 mL de KOH al 50% en un balón de tres bocas y se realiza la saponificación durante 6h a temperatura de 26 °C, se emplea 20 mL de cloruro de metileno para extracción de la materia insaponificable. La muestra tiene una fase homogénea color amarillo, no hay separación de fases.

**2.-** Se coloca 40 mL de KOH al 50% en un balón de tres bocas y se realiza la saponificación durante 6h a temperatura de 26 °C, se emplea 100 mL de cloruro de metileno para la extracción de la materia insaponificable. La separación de fases es lenta, durante 2h con formación de emulsión.

**3.-** Se coloca 40 mL KOH al 50% en un balón de tres bocas y se realiza la saponificación durante 6h a temperatura de 26 °C, en esta oportunidad se emplea 200 mL de cloruro de metileno, mejorando la separación de fases durante 1 h. Se aprecia un cambio de coloración en la fase orgánica debido al arrastre de la muestra saponificada, lo que conlleva a la pérdida de una pequeña fracción de la muestra.

**4.-** Se coloca 40 mL de KOH al 50% en un balón de tres bocas y se realiza la saponificación durante 6h a temperatura de 26 °C, se emplea 100 mL de cloruro de metileno y 20 mL de agua destilada. Mejorando la separación de fases durante 1h; se logra la separación de fases sin arrastre de muestra.

**5.-** Se coloca 40 mL de KOH al 50% en un balón de tres bocas y se realiza la saponificación durante 6h a temperatura de 18 °C, se emplea 20 mL de cloruro de metileno y 20 mL de agua destilada. La separación de fases se realiza durante 30 min.

**6.-** Se coloca 40 mL de KOH al 50% en un balón de tres bocas y se realiza la saponificación durante 6h a temperatura de 18 °C, se emplea 40 mL de cloruro de metileno y 20 mL de agua destilada. La separación de fases es inmediata.

#### **4.2.1.3.- EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y SEPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS SATURADOS:**

##### **1. Saponificación**

Se pesa 40 g del aceite en un balón de tres bocas y se añade gota a gota 40 mL de KOH al 50 % debido a que la reacción es exotérmica, se agrega 1 mL de etanol y se agita vigorosamente la mezcla en una atmósfera de nitrógeno durante 6 h. Temperatura de 18 °C en un sistema a reflujo, obteniéndose una masa amarilla homogénea.

##### **2. Retiro de los materiales insaponificados**

Para esta etapa la muestra se vierte en una pera de separación y se agrega 40 mL de cloruro de metileno y 20 mL de agua destilada. Se agita vigorosamente y se descarta la fase orgánica.

##### **3. Formación de ácidos grasos libres de las sales de potasio:**

Se agrega a la fase acuosa 360 mL de ácido acético al 50 % para la formación de los ácidos grasos libres y se agita vigorosamente. Para lograr una mayor separación de fases se agrega 4 g cloruro de sodio. Se descarta la fase acuosa y la fase orgánica se lava tres veces con ácido acético al 50 %.

##### **4. Purificación de los ácidos grasos con acetona:**

Se añade a la fase orgánica 800 mL de acetona, se deja en reposo a - 20 °C. Se aprecia poca cantidad de precipitado en las paredes del vaso. Los ácidos grasos saturados precipitan y se separan por filtración a un rango de



temperatura de - 20 °C a - 24 °C. Siendo el peso obtenidos de ácidos grasos saturados de 0,27 g.

#### **5. Purificación de los ácidos grasos con NaOH y etanol:**

Se disuelve 4 g de NaOH en 40 mL de agua destilada y 80 mL de etanol en un vaso precipitado, se añade a la solución de acetona de los ácidos grasos y se deja en reposo a - 20 °C: Se obtiene 32 g de ácidos grasos de color amarillo suave. La acetona se recupera en rotavapor.

#### **6. Purificación de los ácidos grasos empleando acetona y acetato de magnesio:**

Se disuelve 10 g de acetato de magnesio en 200 mL de acetona en un vaso precipitado. Se toman 20 mL de ácidos grasos obtenidos anteriormente y se mezclan con la solución de magnesio – acetona. Se agita vigorosamente y se deja en reposo a - 20 °C.

El volumen de la solución del precipitado a temperatura ambiente es 4 mL y el volumen del filtrado es de 12 mL

#### **4.2.2.- DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO:**

**Procedimiento:** método AOAC 920.159 [40]

- Se pesa 0,20 g de muestra en un matraz de 500 mL con 20 mL de  $\text{CCl}_4$ .
- Se agrega 25 mL de Wijs al matraz y se agita para homogenizar.
- Hacer blanco (según norma es conveniente hacer las determinaciones con 5 min de diferencia con el fin de que las muestras y blancos estén en la misma condición).
- Se guarda los matraces en ausencia de luz por 30 min. a 20 °C luego se agrega 20 mL de KI al 15 % mezclar y enseguida se añade 100 mL de agua destilada.
- Se titula con solución estándar de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.1N con agitación constante; hasta que el color amarillo desaparezca, se agrega 1 ó 2 mL de almidón y se continua la titulación hasta desaparición de color azul.

### CÁLCULO:

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(V_{\text{Blanco}} - V_{\text{muestra}}) \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} \times 12,69}{W_m}$$

Donde:  $V_{\text{Blanco}}$  = volumen de blanco

$V_{\text{muestra}}$  = volumen de muestra

$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}$  = normalidad corregida

$W_m$  = peso de muestra

### 4.2.3.- ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS:

**Procedimiento:** Norma ISO 5509-2000 [37] y Norma ISO 5508-1990 [38]

- Se pesa  $100 \pm 0.1$  mg de muestra, dentro de un matraz.
- Se agrega 4 mL de solución de hidróxido de sodio 0,5N metanólico y se coloca a reflujo a  $100^\circ\text{C}$  durante 7 min.
- Se enfría y añade 5 mL de la solución de trifluoruro de boro y se coloca en reflujo a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 min.
- Se enfría entre un rango de  $30 - 40^\circ\text{C}$ , se añade 3 mL iso-octano y se agita vigorosamente durante 30 seg.
- Se añade 5 mL solución saturada de NaCl y se agita.
- Se separa las dos fases y se transfiere la fase de iso-octano a un tubo.
- Se extrae otra vez la fase acuosa/alcohol metílico con 3 mL de iso-octano.
- Se combinan los extractos y se agrega sulfato de sodio anhidro.
- Se inyecta 1  $\mu\text{L}$  de la solución, bajo las condiciones apropiadas al cromatógrafo de gases.

### Condiciones Cromatográficas:

**Equipo:** Cromatógrafo de gases Agilent modelo 6850

**Columna:** Omegawax 250 (30 m de largo, 0,25 mm diámetro interno,  $0,25 \mu\text{m}$  fase líquida)

**Temperatura del Inyector:**  $250^\circ\text{C}$

**Temperatura del Detector:**  $260^\circ\text{C}$

**Horno:**  $140^\circ\text{C}$

### **CÁLCULO:**

$$\% \text{ de área de X} = \left[ \frac{A_x}{\sum_i (A_i)} \right] \times 100$$

Donde:

$A_x$  = área de "X"

$\sum_i (A_i)$  = sumatoria de todas las áreas de la muestra

### **4.2.4.- ANÁLISIS FITOQUÍMICO:**

El Análisis fitoquímico [34], [41] se realiza por ensayos directos sobre la almendra de "sacha inchi".

#### **A.- DETERMINACIÓN DE SAPONINAS**

##### **Prueba de la espuma**

A 5 mL una solución acuosa de la muestra en un tubo de ensayo se agita durante 30 segundos. Se aprecia formación de espuma persistente dando reacción positiva.

##### **1.- Reactivo de Salkowsky**

A 0.2 g de la muestra en un tubo de ensayo se añade 1 mL de  $H_2SO_{4cc}$  y 5 gotas de  $Ac_2O$ . Se aprecia coloración rojo sangre dando reacción positiva.

##### **2.- Reactivo de Liberman – Buchard**

A la muestra contenida en un tubo de ensayo se añade 5 gotas de HOAc y 3 mL de  $Ac_2O/H_2SO_4(50:1)$ . Se aprecia coloración verde suave, indica la presencia de saponinas esteroidales.

##### **3.- Variante de Reacción de Salkosky**

A la muestra disuelta en cloroformo se agrega 1 mL  $H_2SO_4cc$ . Se aprecia coloración rojo grosella intenso, indica la presencia de saponinas triterpénicas.

## **B.- DETERMINACIÓN DE CUMARINAS:**

### **Procedimiento:**

Se pesa 15 g de muestra se añade 100 mL de agua y se hierve durante 5 min.

### **Cumarina Fija**

Se coloca en un papel de filtro dos gotas de extracto acuoso y dos gotas de NaOH 10 %, se observa en lámpara UV 366 nm. Se aprecia fosforescencia con lámpara UV indicando la presencia de cumarinas fijas.

## **C.- DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES:**

### **Extracción de alcaloides:**

Se procede a la extracción en dos viales de 20mL. Se trabaja con la almendra del "sacha inchi".

1.- En un vial se coloca 3 g de muestra en solución etanólica ácida de HCl 1 N durante 3 min.

2.- En el segundo vial se coloca 3 g de muestra en solución acuosa ácida de HCl 1 N durante 3 min.

### **1.- Reactivo de Dragendorff**

Se agrega 5 gotas de este reactivo a una solución ácida de alcaloide.

La solución acuosa ácida y la solución etanólica ácida de la almendra de "sacha inchi" dan un precipitado abundante de color naranja suave.

### **2.- Reactivo de Mayer**

Agregar el reactivo a la solución ácida de alcaloide. La solución acuosa ácida y la solución etanólica ácida de la almendra de "sacha inchi" dan un precipitado abundante de color crema.

### **3.- Reactivo de Wagner**

Agregar el reactivo a la solución ácida de alcaloide.

La solución acuosa ácida y la solución etanólica ácida de la almendra de “sacha inchi” dan un precipitado abundante de color marrón.

### **4.- Reacción de Sonneschein**

Agregar el reactivo a la solución ácida de alcaloide. La solución acuosa ácida y la solución etanólica ácida de la almendra de “sacha inchi” dan un precipitado abundante de color amarillo.

## V.- EJEMPLOS DE CÁLCULOS

### 5.1.- ÍNDICE DE YODO [40]

Cálculo del índice de yodo en una muestra; por ejemplo M1

Reemplazando en la fórmula los datos de la muestra M1 – 1 se obtiene:

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(V_{\text{Blanco}} - V_{\text{muestra}}) \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} \times 12,69}{W_m}$$

$$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = 0.0998 \text{ N}$$

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(46,75 - 13.5) \times 0,0998 \times 12,69}{0.22}$$

$$\text{Índice de yodo} = 192$$

De la misma manera se procedió para la muestra M1 - 2 y M1 - 3 obteniéndose un promedio final de 192 de índice de yodo.

Muestra M1	Peso (g)	Promedio de V <sub>blanco</sub>	V <sub>muestra</sub> (mL)	Índice de yodo	Valor Promedio
1	0.22	46.75	13.5	191	192
2	0.22	46.75	13.4	192	
3	0.22	46.75	13.4	192	

Se repite para la muestra M2, M3 y M4.

## 5.2.- DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Para el cálculo se toma como ejemplo M4, así mismo se realizó para cada ácido graso de las muestras: M1, M2 y M3. El método empleado es “Normalización de áreas” [39] el cual es un cálculo de porcentajes de áreas que se asume que es igual al porcentaje en peso, cuya fórmula es:

$$\% \text{ de área de X} = \left[ \frac{A_x}{\sum_i (A_i)} \right] \times 100$$

Ácidos grasos	Área	Sumatoria de área total	% Área	% Área promedio
Ácido palmítico	292,09299	12687,88556	2,3021408	2,30214
Ácido esteárico	81,95162	12687,88556	0,6459045	0,64590
Ácido oleico (omega 9)	1108,08203	12687,88556	8,733386	8,73339
Ácido linoleico (omega 6)	4777,87549	12687,88556	37,6569876	37,65699
Ácido eicosenoico	33,86829	12687,88556	0,2669341	0,26693
Ácido linolénico (omega 3)	6394,01514	12687,88556	50,3994647	50,39465

Aplicando la fórmula para la determinación del ácido linoleico:

$$\% \text{ de área de X} = \left[ \frac{A_x}{\sum_i (A_i)} \right] \times 100$$

$$\% \text{ de área de ácido linoleico} = \left[ \frac{4777,87549}{12687,88556} \right] \times 100$$

$$\% \text{ de área de ácido linoleico} = 37,6569876$$

## VI.- RESULTADOS

**TABLA 6:** Determinación del peso de KOH

$W_{aceite}$ (g)	$W_{KOH}$ (g)	$V_{agua}$ (mL)	T (°C)	t (h)	Observación
40	10	Solución saturada	26	1	1 fase, masa sólida amarilla.
40	15	200	26	1	2 fases, difícil separar fase orgánica.
40	25	200	26	4	2 fases, difícil separar fase orgánica.
40	50	100	26	6	1 fase amarilla crema.

**TABLA 7:** Determinación de volumen de solvente y temperatura

$W_{aceite}$ (g)	$V_{KOH50\%}$ (mL)	t (h)	T(°C)	$V_{CH_2Cl_2}$ (mL)	$V_{agua}$ (mL)	Observación
40	40	6	26	20	-	1 fase, con el solvente no hay separación de fases
40	40	6	26	100	-	2 fases, lento aprox. 2h forma emulsión
40	40	6	26	200	-	2 fases, mejora un poco aprox. 1h arrastra muestra
40	40	6	26	100	20	Mejora separación de fases aprox. 1h No arrastra muestra
40	40	6	18	20	20	Mejora separación de fases aprox.30 min. No arrastra muestra
40	40	6	18	40	20	Mejora separación de fases inmediata, no arrastra muestra



**TABLA 8:** Condiciones óptimas de trabajo para separar los ácidos grasos

$W_{aceite}(g)$	$V_{KOH\ 50\%}(mL)$	$V_{CH_2Cl_2}(mL)$	$V_{agua}(mL)$	T (°C)	t (h)
40	40	40	20	18	6

Si:  $W_{aceite}(g)$  = peso de aceite

$W_{KOH}(g)$  = peso de KOH

$V_{KOH\ 50\%}(mL)$  = volumen de KOH al 50%

$V_{agua}$  = volumen de agua

$V_{CH_2Cl_2}(mL)$  = volumen de  $CH_2Cl_2$

t (h) = tiempo de reacción

T (°C) = temperatura

**TABLA 9:** Valores obtenidos en la extracción de los ácidos grasos y separación de los ácidos grasos saturados

$W_{aceite}(g)$	$W_{M2}(g)$	$W_{saturados}(g)$	$V_{M3}(mL)$	$V_{M4}(mL)$
40	32	0.27	4	12

$W_{aceite}(g)$  = peso de aceite **M1**

$W_{M2}(g)$  = peso de la mezcla de ácidos grasos **M2**

$W_{saturados}(g)$  = peso de ácidos grasos saturados

$V_{M3}(mL)$  = volumen de la solución del precipitado **M3**

$V_{M4}(mL)$  = volumen de la solución del filtrado **M4**

**TABLA 10:** Valores de la composición de los ácidos grasos:  
anexo 9 – anexo 12

1: Aceite sin tratar **M1**

2: Mezcla de ácidos grasos **M2** (etapa 5 purificación con NaOH y etanol)

3: Precipitado de los ácidos grasos **M3** (etapa 6 purificación con acetato de magnesio y acetona)

4: Filtrado de los ácidos grasos **M4** (etapa 6 purificación con acetato de magnesio y acetona)

Muestra		Valor M1 (%)	Valor M2 (%)	Valor M3 (%)	Valor M4 (%)
Ácidos grasos	Cn:m				
Ácido palmítico	C16:0	4,01416	3,47964	4,05877	2,30214
Ácido heptanoico	C17:0	0,09370	0,07351	0,08892	---
Ácido esteárico	C18:0	3,03981	1,77651	2,24121	0,64590
Ácido oleico (omega 9)	C18:1	8,74053	8,55800	8,60824	8,73339
Ácido linoleico (omega 6)	C18:2	35,57038	49,73703	35,68286	37,65699
Ácido araquídico	C20:0	0,08816	0,06149	0,07712	---
Ácido eicosenoico	C20:1	0,28825	0,27171	0,28988	0,26693
Ácido linolénico (omega 3)	C18:3	48,16502	35,99455	48,95299	50,39465

Si: n = número de carbonos

m = número de dobles enlaces

--- = no presente

**TABLA 11:** Composición de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados

Muestra	Valor M1 (%)	Valor M2 (%)	Valor M3 (%)	Valor M4 (%)
Saturado	7,23583	5,39115	6,46602	2,94804
Monoinsaturados	9,02878	8,82971	8,89812	9,00032
Poliinsaturados	83,7354	85,73158	84,63585	88,05164

**TABLA 12:** Valores del índice de yodo

Muestra	Valor de índice de yodo
Valor M1	192
Valor M2	192
Valor M3	190
Valor M4	196

1: Aceite sin tratar **M1**

2: Mezcla de ácidos grasos **M2** (etapa 5 purificación con NaOH y etanol)

3: Precipitado de los ácidos grasos **M3** (etapa 6 purificación con acetato de magnesio y acetona)

4: Filtrado de los ácidos grasos **M4** (etapa 6 purificación con acetato de magnesio y acetona)

**TABLA 13:** Determinación de saponinas

Ensayos	Almendra (sacha inchi)
Prueba de espuma	+++
1.- Reactivo de Salkowsky	+++
2.- Variante de reacción de Salkowsky	+++
3.- Reactivo de Liebermann – Buchard	++

**TABLA 14:** Determinación de cumarina

Ensayos	Almendra (sacha inchi)
Cumarina fija	++

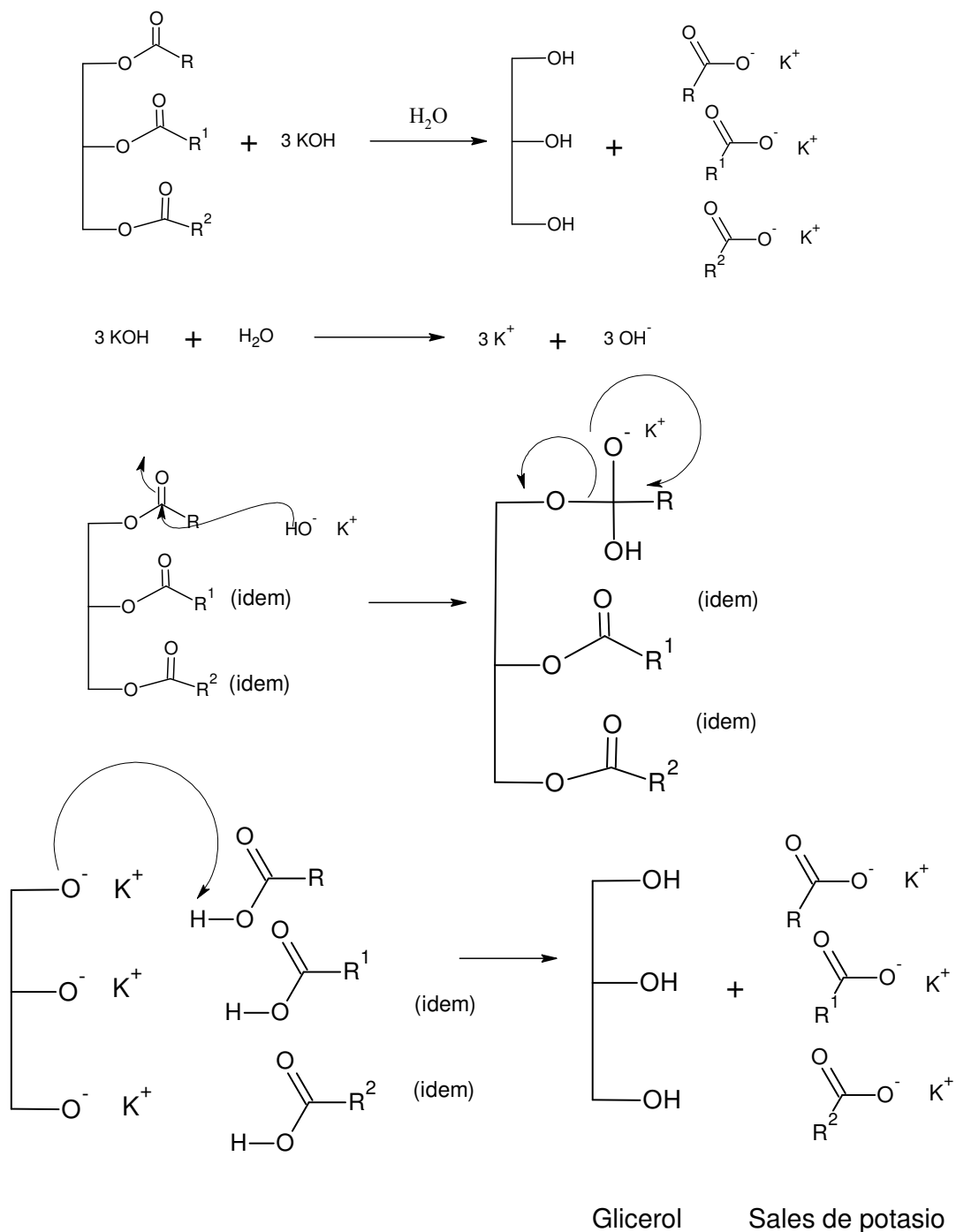
**TABLA 15:** Determinación de alcaloides

	Almendra (sacha inchi) extracto acuoso	Almendra (sacha inchi) extracto etanólico
Reactivo de Dragendorff	++	++
Reactivo de Mayer	+++	+++
Reactivo de Wagner	+++	+++
Reacción de Sonneschein	+++	+++

Simbología: (-) No detectable  
 (+) Poco o escaso  
 (++) Moderado  
 (+++) Abundante

## 6.1.- REACCIONES

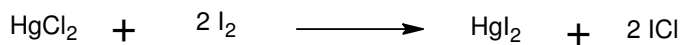
### 6.1.1.- Reacción de Saponificación:



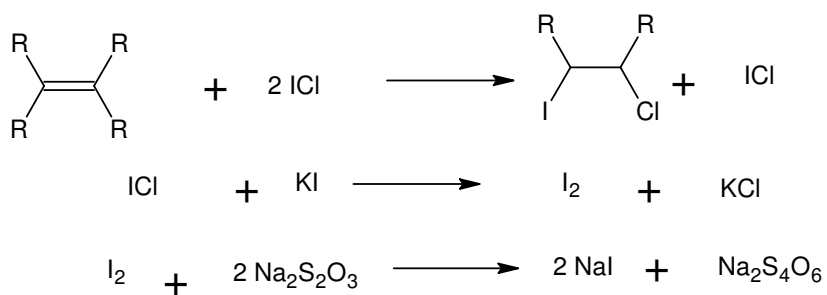
Idem: Significa que este paso se repite al igual que el paso anterior descrito.

### 6.1.2.- Índice de yodo

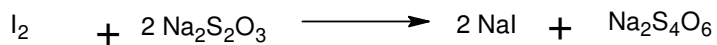
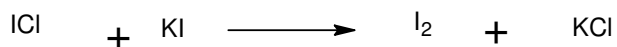
#### Formación de reactivo de Wijs



#### Muestra

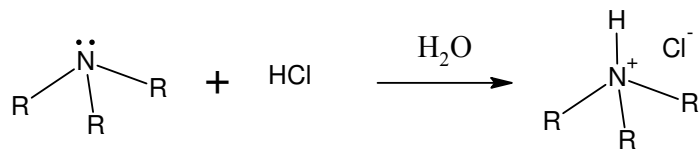


#### Blanco

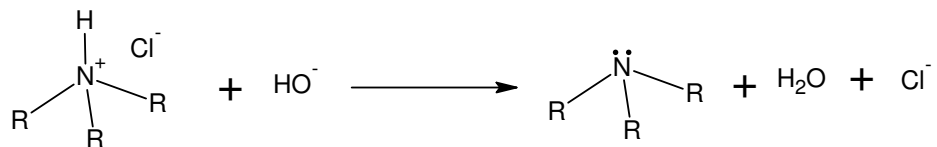


### 6.1.3.- Reacción de alcaloides:

- Extracción del alcaloide en medio acuoso ácido:



- Regeneración:

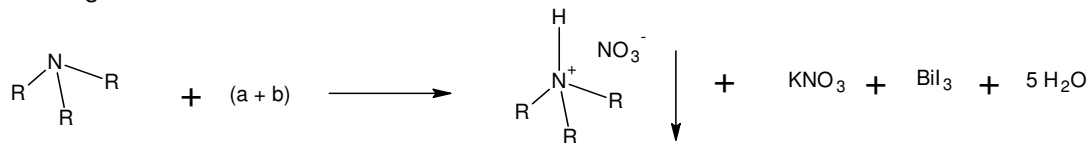


## Reacciones de precipitación:

### - Reactivo dragendorff:

a: 8 g  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  / 20 mL  $\text{HNO}_3$

b: 272 g  $\text{KI}$  / 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$

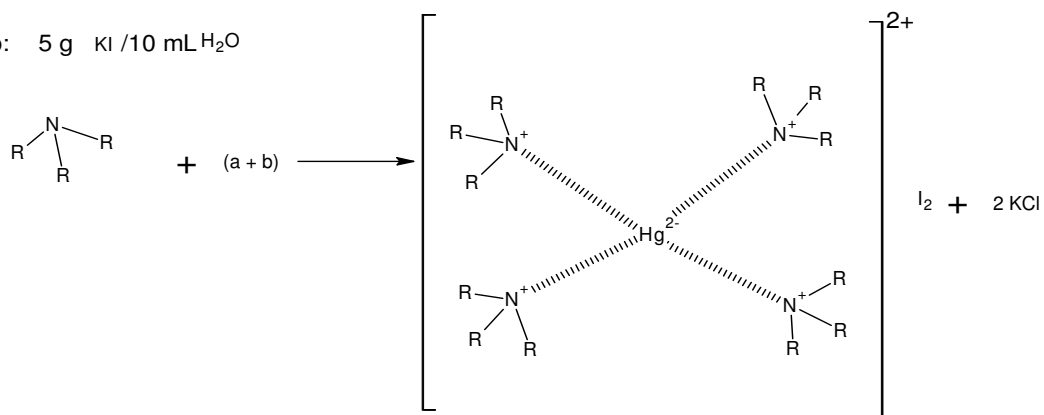


Precipitado naranja suave

### - Reactivo de mayer:

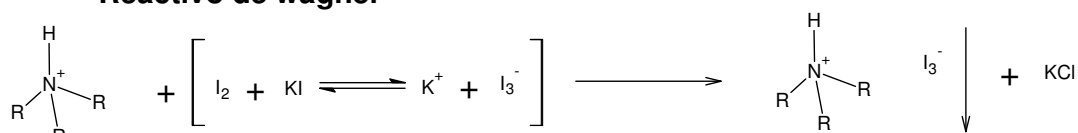
a: 1.36 g  $\text{HgCl}_2$  / 60 mL  $\text{H}_2\text{O}$

b: 5 g  $\text{KI}$  / 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$



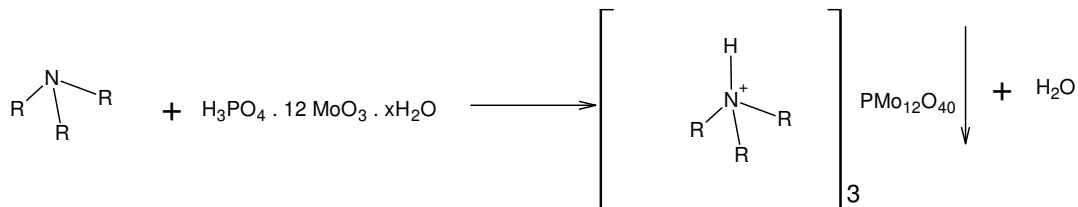
Precipitado crema

### - Reactivo de wagner



Precipitado marrón

### - Reactivo de sonneschein



Precipitado amarillo

## VII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se empleó la técnica de la patente 6846942 de EE.UU para el aceite de “sacha inchi”. El inicio del procedimiento implica hallar las condiciones óptimas de trabajo para la separación de la mezcla de ácidos grasos de este recurso vegetal. Siendo los valores encontrados: porcentaje de KOH al 50 % para la saponificación, obteniéndose una sola fase, muy conveniente para la realización de nuestro procedimiento. Este porcentaje nos ayuda a visualizar la separación de la materia insaponificable. El volumen de cloruro de metileno utilizado es de 40 mL para la extracción de materia insaponificable, tiempo de reacción hallado es de 6 h y la temperatura de trabajo de 18 °C, a estas condiciones se facilita la separación de las fases.

El procedimiento seleccionado se basa en un primer paso en la saponificación de las grasas o aceite natural **M1** con la consecuente conversión de los triglicéridos a una sal. Esta sal se acidifica para obtener los ácidos grasos libres. Esta técnica utiliza temperaturas bajas (hasta – 20 °C), con lo que se evita la oxidación del producto.

Después de la saponificación, la materia insaponificable se extrae con un solvente no polar como cloruro de metileno. El solvente extrae de la materia insaponificable las vitaminas A, E y los hidrocarburos. Se emplea cloruro de metileno debido que se obtiene una mejor separación de fases con respecto a otros solventes como: éter de petróleo, éter etílico, etc. empleados.

En la etapa de acidificación de la fase acuosa se logra obtener los ácidos grasos libres formados de la sal de potasio utilizando ácido acético. Esta acidificación hará que los ácidos grasos libres se separen en la fase orgánica. La adición de 4 g cloruro de sodio ayuda a una mejor separación de fases. La fase acuosa se descarta.

Para purificar los ácidos grasos, la fase orgánica que contiene los ácidos grasos libres, se disuelven en acetona y se llevan a – 20 °C. Los ácidos grasos saturados precipitan y se separan por filtración.

Para seguir purificando los ácidos grasos y separar los ácidos grasos saturados de la muestra se emplea NaOH y etanol en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , logrando separar un 1,85 % de ácidos grasos saturados **M2** (7,24 % - 5,39 %).

El procedimiento utilizado para conseguir que de la mezcla de ácidos grasos disminuya una cantidad de ácidos grasos saturados es con la utilización de sales de magnesio disueltas en acetona. Esta técnica novedosa hace que los ácidos grasos insaturados sean mucho más solubles en acetona que la sal de magnesio de los ácidos grasos saturados. Esta diferencia de solubilidad es incluso mayor a temperaturas bajo cero, de esta manera se logra separar los ácidos grasos saturados de los insaturados en mayor proporción.

Con respecto al control de calidad de los ácidos grasos obtenidos se realizan los siguientes análisis:

**Índice de Yodo.-** El valor del índice de yodo del aceite de “sacha inchi” sin tratar (M1) es 192 y en la mezcla de ácidos grasos (M4) es 196; se aprecia un aumento en el valor del índice de yodo, este valor nos confirma la extracción de un porcentaje de ácidos grasos saturados.

Al aumentar el índice de yodo se comprueba una mayor insaturación en la muestra: Siendo la muestra M4 la de mayor valor de índice de yodo.

**Espectroscopia infrarroja.-** Es uno de los métodos más empleados debido a su simplicidad. Las muestras en nuestro caso se analizaron por transmitancia, por medio de un disco de KBr el cual sujeta a una delgada película de la muestra.

Se escanea entre  $4000$  a  $400\text{cm}^{-1}$  y de 0 a 100%T para el aceite de “sacha inchi” sin tratar (M1) y para la mezcla de ácidos grasos extraídos (M2).

Anexo 4: Muestra en el espectro FTIR del aceite de “sacha inchi” sin tratar (M1)

Se pueden apreciar las bandas características en un espectro IR típicos a  $3008.55\text{ cm}^{-1}$  (grupo  $-\text{CH}_3$  tensión),  $2926.26\text{ cm}^{-1}$  y  $2855.48\text{ cm}^{-1}$  (grupo C – H tensión),  $1744.88\text{ cm}^{-1}$  (grupo C=O),  $1652.21\text{ cm}^{-1}$  (grupo C=C),  $1457.84\text{ cm}^{-1}$  (grupo C – H tijereteo),  $1372.46\text{ cm}^{-1}$  (grupo C – H balanceo),  $1099.83\text{ cm}^{-1}$



(grupo C-O),  $719.69\text{ cm}^{-1}$  (grupo C – H balanceo).

#### Anexo 5: Solución de la mezcla de ácidos grasos extraídos (M2)

Se pueden apreciar las bandas características en un espectro IR típicos a  $3008.55\text{ cm}^{-1}$  (grupo  $-\text{CH}_3$  tensión),  $2926.48\text{ cm}^{-1}$  y  $2855.54\text{ cm}^{-1}$  (grupo C - H tensión),  $1744.10\text{ cm}^{-1}$  (grupo C=O),  $1647.66\text{ cm}^{-1}$  (grupo C=C),  $1457.84\text{ cm}^{-1}$  (grupo C – H tijereteo),  $1372.50\text{ cm}^{-1}$  (grupo C – H balanceo),  $1099.37\text{ cm}^{-1}$  (grupo C-O),  $719.45\text{ cm}^{-1}$  (grupo C – H balanceo)

Los espectros de M1 y M2 muestran una similitud con los espectros IR de los estándares en la región de grupos funcionales ( $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ ), pero en la región de la huella dactilar no se puede distinguir los ácidos extraídos (linolénico y linoleico), debido a que en dicha zona también hay picos que representan la absorción de radiación infrarroja en ciertos grupos funcionales. Esta técnica nos ayuda a identificar los principales grupos funcionales pero no separa los componentes de la muestra.

**Cromatografía de Gases.-** Se determinó la composición de los ácidos grasos (M3) obteniéndose 6,47% de ácidos grasos saturados, 84,64 % de ácidos grasos poliinsaturados y la composición de ácidos grasos (M4) es 2,95% de ácidos grasos saturados y 88,05% de ácidos grasos insaturados. Se aprecia una disminución de 4,29 % de los ácidos grasos saturados con respecto al aceite de sachá inchi y un aumento de 4.31% en el porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados.

Del estudio Fitoquímico utilizando ensayos directos sobre la almendra del “sachá inchi” se determinó cualitativamente algunos metabolitos secundarios: como presencia significativa de alcaloides, saponinas y cumarinas fijadas.

## VIII.- CONCLUSIONES

- En el procedimiento de la patente N° 6846942 para separar los ácidos grasos, indica en la primera etapa la realización de una saponificación y luego se acidifica para la liberación de los ácidos grasos. Utilizando el aceite virgen extraído de la almendra del “sacha inchi” se ha obtenido un aumento en un 4,31 % en la cantidad de los ácidos grasos insaturados, disminuyendo en un 4,29 % los ácidos grasos saturados de la mezcla de ácidos grasos obtenida. Estos valores nos demuestran que en la mezcla obtenida se encuentra una mayor proporción de ácidos grasos insaturados, debido a la extracción de los ácidos grasos saturados en el procedimiento.
- Con respecto a la cromatografía de gases trabajadas según la norma ISO 5509 - 2000 y norma ISO 5508 - 1990: la muestra original (M1) reporta 92,76 % de insaturados y para los ácidos grasos (M3) de 93,53 % de insaturados y para la muestra final (M4) es de 97,05 %.
- El índice de yodo comprueba que en la mezcla de ácidos grasos obtenida existe un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados. (valores M1 y M2 192 a 196 respectivamente).
- Se determinó cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en la almendra del “sacha inchi” encontrándose significativamente alcaloides, saponinas y cumarinas fijas.
- La obtención de la mezcla de ácidos grasos del aceite de “sacha inchi” obtenida contribuirá a una mejor utilización de este producto natural con beneficios económicos para el país.
- La mezcla obtenida de ácidos grasos podrá exportarse para la utilización en diferentes industrias como: alimentos por su valor nutritivo, cosméticos, productos biológicos, pinturas, etc.

## **IX.- RECOMENDACIONES**

- El proceso de saponificación se recomienda realizarlo en atmósfera controlada con un gas inerte como nitrógeno para evitar el contacto con el oxígeno y por lo tanto su oxidación.
- Por ser una reacción exotérmica la saponificación, se debe agregar con sumo cuidado el hidróxido de potasio.
- Para la obtención de los ácidos grasos libres se utiliza ácido acético.

## X.- BIBLIOGRAFÍA

1. John McMuray Química Orgánica 5ta edición pág. 1118
2. Lipid studies <http://www.cyberlipid.org/cyberlip/desc0004.htm#top> (vigente a la fecha 18/08/07).
3. Curso de biomoléculas <http://www.ehu.es/biomoleculas/LIP/LIPID3.htm> (vigente a la fecha 18/08/07).
4. Hayes, K: C., Pronczuk, A., Lindsey, S. y Diersen-Schade, D. 1991. Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, 16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoprotein in nonhuman primates. American Journal of Clinical Nutrition. 53: 491- 498.
5. Lands, W. The fate of polyunsaturated fatty acids. En: Simopolous, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. Health effects of polyunsaturated fatty acids in sea foods. The United States of the American. Academy Press. Inc. 1986. Pág. 33-48.
6. Grundy. Cap 9. En: Simopolous, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. Health effects of polyunsaturated fatty acids in sea foods. The United States of the American. Academy Press. Inc. 1986. Pág. 33-48.
7. Weber, P.C., Fisher, S., von Schacky, C., Lorenz, R. y Strasser, T. Dietary Omega -3 polyunsaturated fatty Acid and Eicosanoid formation in man. En: Simopolous, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. Health effects of polyunsaturated fatty acids in sea foods. The United States of the American. Academy Press. Inc. 1986. Pág. 49-60.
8. Barbosa, D.S., Cecchini, R., El Kadri, M.Z., Rodríguez, M.A., Burini, R.C., Dichi, 2003. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. Nutrition 19, 837-842.
9. Roynette, C.E., Calder, P.C., Dupertuis, Y.M., Pichard, C., 2004. *n* - 3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. Clin. Nutr. 23, 139 - 51.
10. Remans, P.H., Sont, J.K., Wagenaar, L.W., Wouters-Wesseling, W., Zuijderduin, W.M., Jongma, A., Breedveld, F.C., Van Laar, J.M., 2004. Nutrient supplementation with polyunsaturated fatty acids and

- micronutrients in rheumatoid arthritis: clinical and biochemical effects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 839 – 845.
11. Curtis, C.L., Hughes, C.E., Flannery, C.R., Little, C.B., Harwood, J.L., Caterson, B., 2000. *n*-3 Fatty acids-specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J. Biol. Chem.* 275, 721–724.
  12. International Journal of Pharmaceutics 299 (2005) 41–48 In vitro percutaneous absorption studies and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity of essential fatty acids (EFA) from fish oil extracts Carmelo Puglia, Salvatore Tropea, Luisa Rizza, Natale Alfredo Santagati, Francesco Bonina Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Catania, Viale A.Doria no. 6, 95125 Catania, Italy
  13. Valenzuela B., Alfonso y Nieto K., Susana. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev. chil. pediatr.* [online]. Mar. 2003, vol.74, Nº 2 [citado 27 Agosto 2007], p.149-157. ISSN 0370-4106.
  14. Madretierra Medicina Natural - Complementos Alimenticios.
  15. Bailey, L.L. 1949. Manual of cultivated plants. The Mac Millan Co. New York. 118 p.
  16. Stanley, P.C. And S.A. Steyemark. 1949. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany vol. 24 part VI. pp. 153-156. Chicago Natural History Museum
  17. Macbride, J.F. 1951. Euphorbiaceae. In Flora of Perú. Botanical series vol. 13, part. IIIA, Nº 1. Field Museum of Natural History. 115-118 p.
  18. Valles, C.R. 1992. Revista Pura Selva. Tingo María, Perú. pp. 40-41.
  19. Arevalo, G.G. 1990-1995. Colección, caracterización y mantenimiento de germoplasma de oleaginosas nativas. In Tarapoto, Perú. INIA, Estación Experimental El Porvenir. Informe Anual 1990-1995. Tarapoto s.p.
  20. Lipid studies [Http://www.Cyberlipid.Org/](http://www.Cyberlipid.Org/) vigente a la fecha (18/08/07)
  21. *Angew Chem.* 1895, 8, 721 de Z; 1896, 9, 221
  22. Brown JB et al., *J Am Chem Soc* 1937, 59, 3-6; 6-8
  23. Lipid studies <http://www.cyberlipid.org/fattyt/fatt0001.htm#2> (vigente a la fecha 18/08/07)
  24. Conjugated linolenic acids and methods of preparation and purification and uses thereof - Patent 20060281815

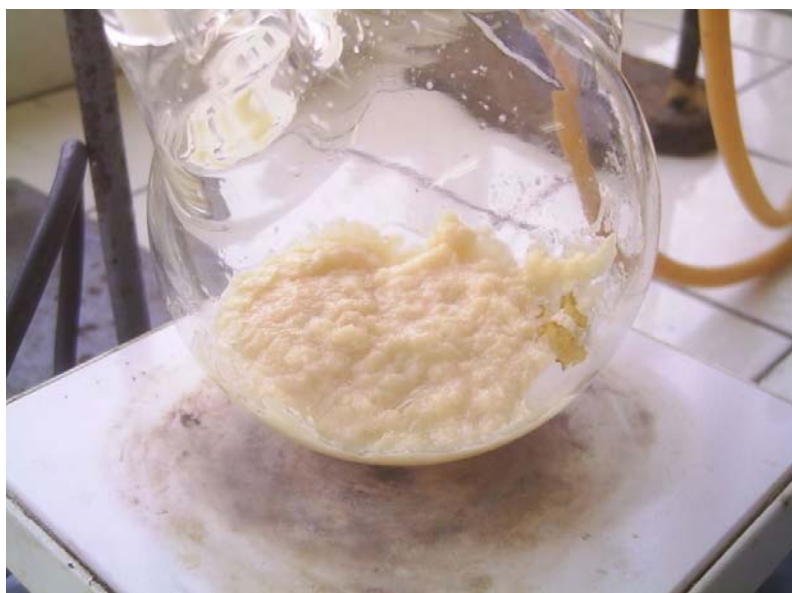
25. Method for reducing saturated fatty acids from fatty acid compositions  
Patent 5952518
26. Process for the extraction of polyunsaturated fatty acid esters from fish oils  
United States Patent 5130061.htm 5130061
27. Funk CD. Prostaglandinas y leukotrienes: avances en eicosanoid  
Biología. Science 2001; 294:1871-5.
28. Olquhoun DM. Nutraceuticals: vitaminas y otros nutrientes en  
Enfermedad coronaria. Curr Opin Lipido 2001; 12:639-46.
29. Microencapsulated unsaturated fatty acid or fatty acid compound or mixture  
of fatty acids and/fatty acid compounds United States Patent 6234464  
Publication Date: 05/22/2001.
30. Skeletal isomerization of fatty acids United States Patent 20030100780  
publication date: 05/29/2003.
31. Conjugated fatty acid esters United States Patent 20050165100
32. Encapsulated polyunsaturated fatty acids United States Patent  
20060134180
33. Fatty acid based herbicidal compositions United States Patent 5098467
34. Olga Look de Ugaz Investigación Fitoquímica métodos en el estudio de  
productos naturales Pág 58- 83,208
35. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),  
Japan [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng)  
(vigente a la fecha)
36. Método para preparar EPA y DHA puro Patente 6846942 de Estados  
Unidos.
37. Norma ISO 5509-2000
38. Norma ISO 5508-1990
39. Basic Gas Chromatography – Harold Mc Nair Pág: 134-135
40. Official Methods of Analysis of AOAC International 2000. 17<sup>th</sup> edition. Vol II.  
Maryland. USA. Metodo AOAC 920.159
41. Guía de prácticas del Laboratorio de Productos Naturales del  
Departamento de Química Orgánica EAPQ – FQIQ UNMSM 2006

## XI.- ANEXO

### ANEXO 1:



**Figura Nº 10:** Equipo de Schlenk para la saponificación en atmosfera inerte



**Figura Nº11:** Muestra saponificada

## ANEXO 2:



**Figura Nº12:** Precipitación de los ácidos grasos saturados en acetona



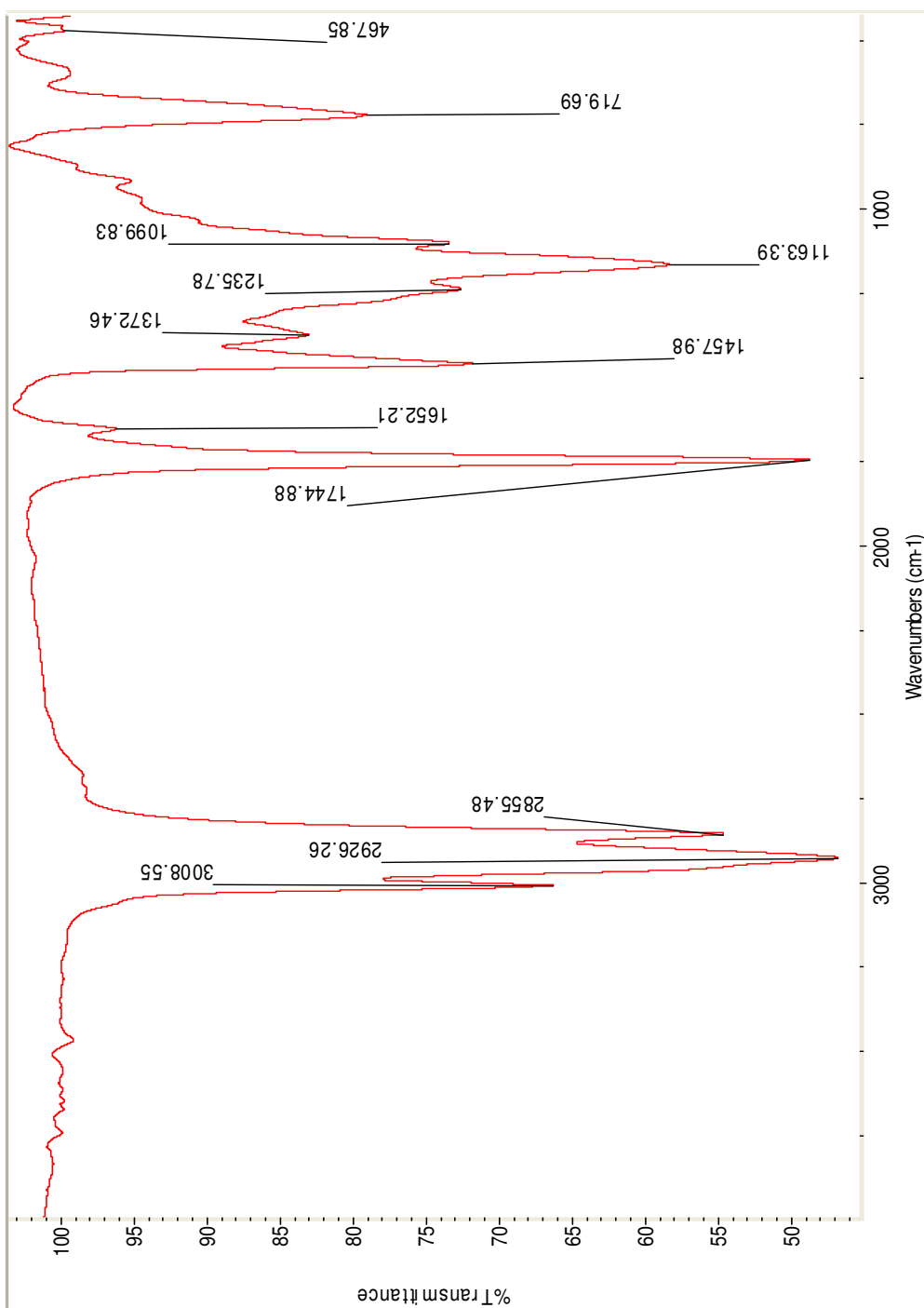
**Figura Nº 13:** Recuperación del solvente



**ANEXO 3:**

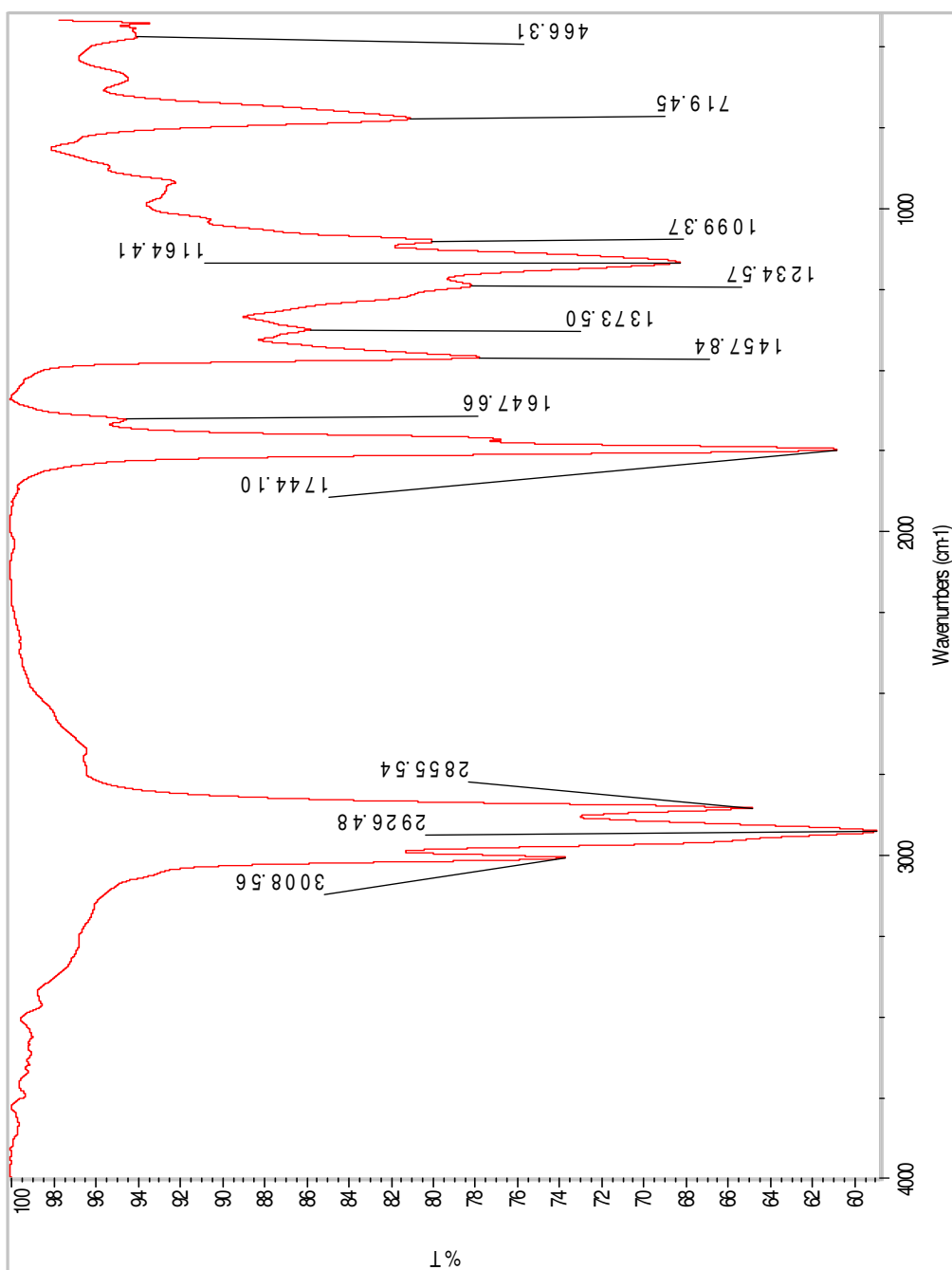


**Figura Nº 14:** Mezcla de ácidos grasos



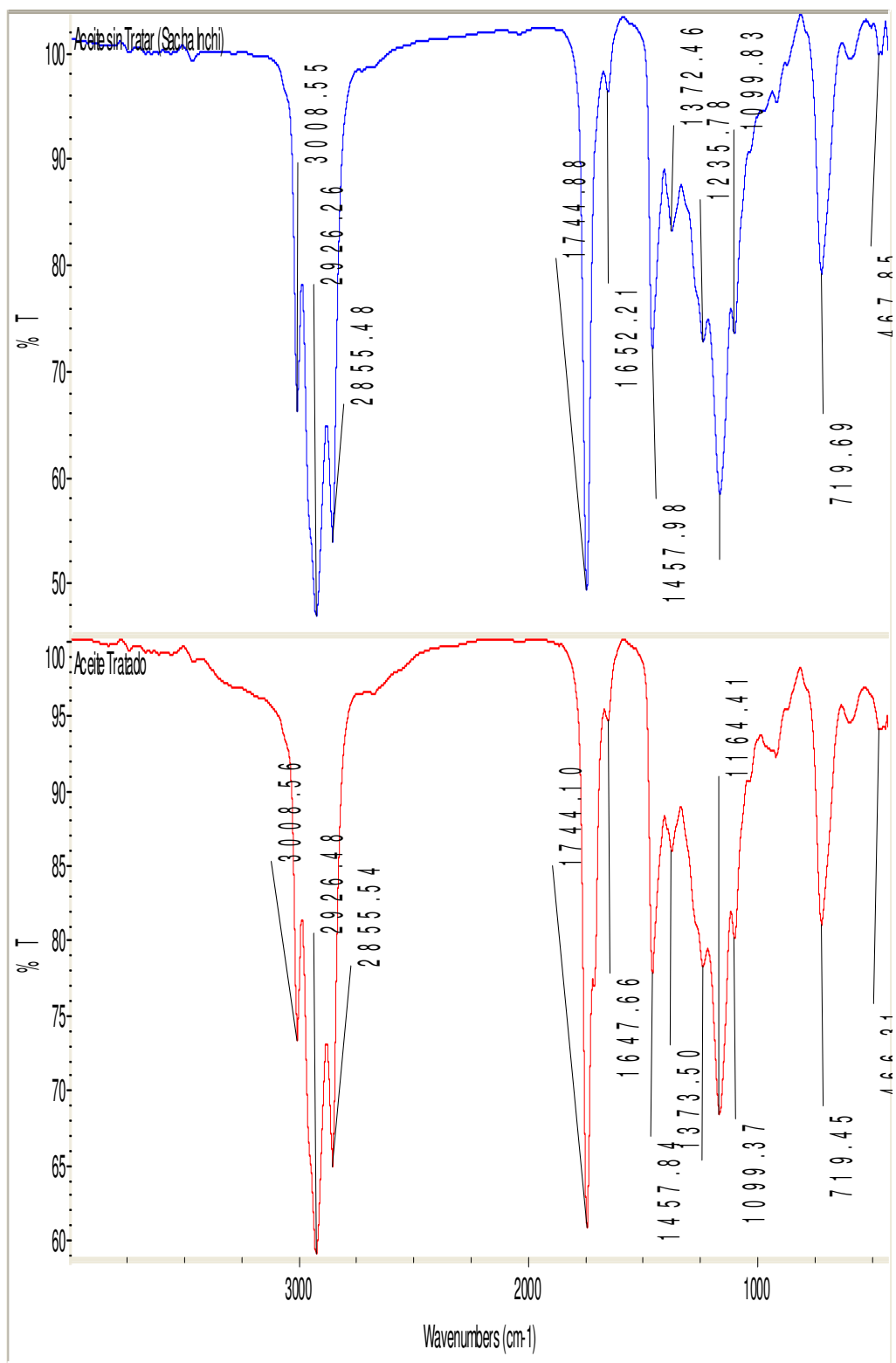
**Anexo N°4:** Espectro FTIR muestra de aceite del “sacha inchi” sin tratar (M1)

Se pueden apreciar las bandas características en un espectro IR típicos a  $3008.55\text{cm}^{-1}$  (grupo  $-\text{CH}_3$  tensión),  $2926.26\text{cm}^{-1}$  y  $2855.48\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C} - \text{H}$  tensión),  $1744.88\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C}=\text{O}$ ),  $1652.21\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C}=\text{C}$ ),  $1457.84\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C} - \text{H}$  tijereteo),  $1372.46\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C} - \text{H}$  balanceo),  $1099.83\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C}-\text{O}$ ),  $719.69\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C} - \text{H}$  balanceo).

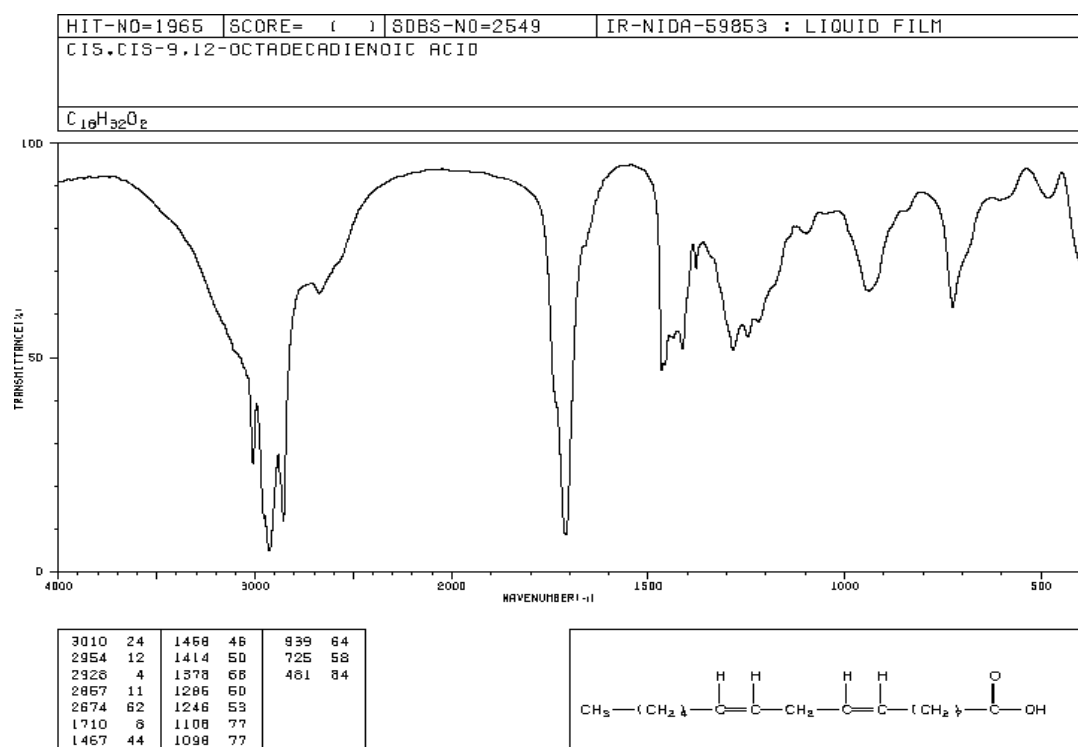
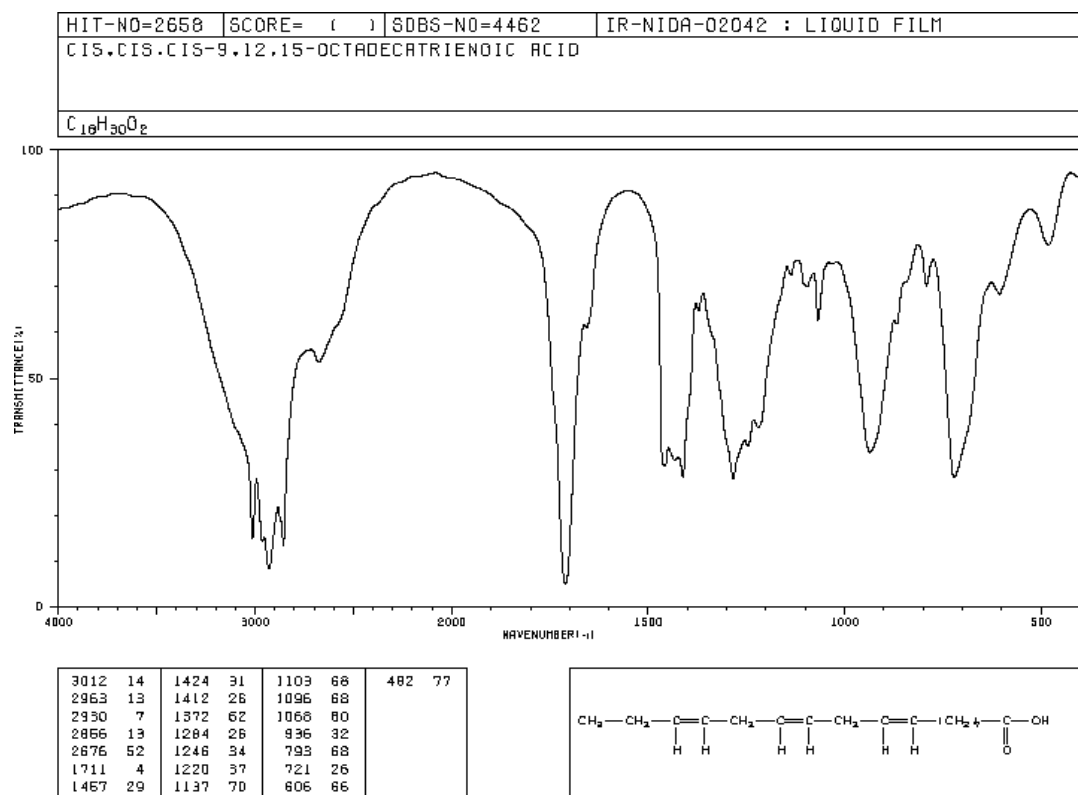


#### **Anexo N°5:** Espectro FTIR mezcla de ácidos grasos extraídos (M2)

Se pueden apreciar las bandas características en un espectro IR típicos a  $3008.55\text{cm}^{-1}$  (grupo  $-\text{CH}_3$  tensión),  $2926.48\text{cm}^{-1}$  y  $2855.54\text{cm}^{-1}$  (grupo C – H tensión),  $1744.10\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C}=\text{O}$ ),  $1647.66\text{cm}^{-1}$  (grupo  $\text{C}=\text{C}$ ),  $1457.84\text{cm}^{-1}$  (grupo C – H tijereteo),  $1372.50\text{cm}^{-1}$  (grupo C – H balanceo),  $1099.37\text{cm}^{-1}$  (grupo C-O),  $719.45\text{cm}^{-1}$  (grupo C – H balanceo)

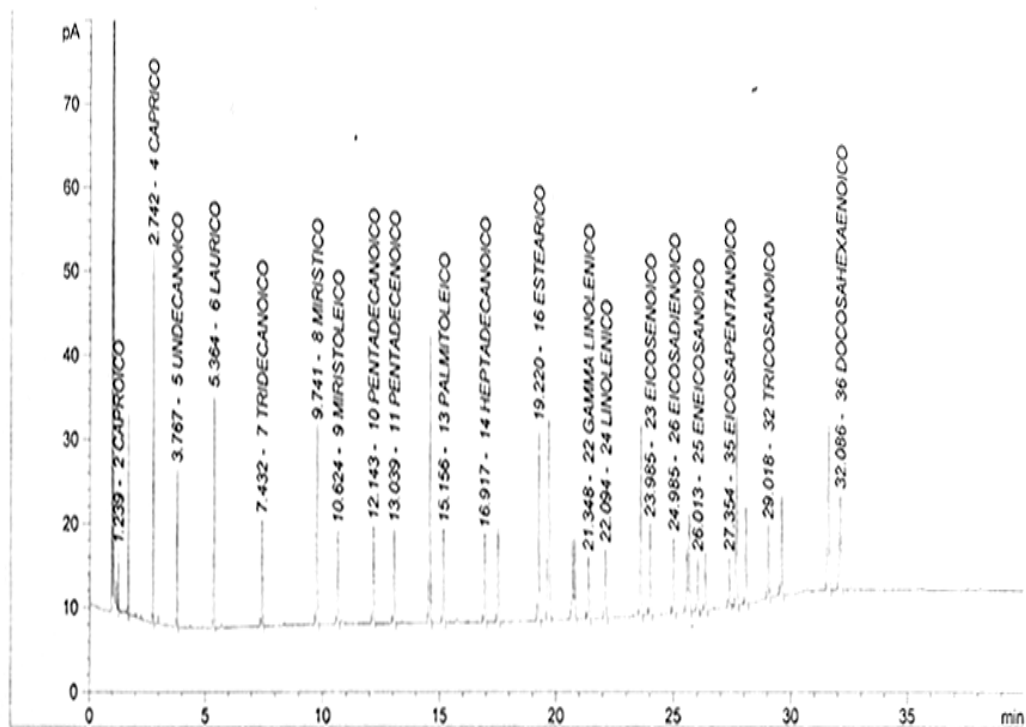


**Anexo N°6:** Comparación de espectros FTIR de M1 y M2



**Anexo N°7:** Espectros IR de estándares: Proporcionados por Spectral Database for Organic Compounds, SDBS, [National Institute of Advanced Industrial Science and Technology \(AIST\)](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/), Japón.

**Anexo N°8: Cromatograma y perfil de los ácidos grasos**  
(Aceite de pescado)



Area Percent Report

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : Thursday, 21 21e June 21e 2007 09:31:59 a.m.  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	1.239	BB	0.0112	4.98916	0.28119	2 CAPROICO
2	1.672	BB	0.0128	19.68167	1.10926	3 CAPRILICO
3	2.742	BB	0.0211	60.72939	3.42271	4 CAPRICO
4	3.767	BB	0.0310	36.95149	2.08258	5 UNDECANOICO
5	5.364	BB	0.0435	77.43968	4.36450	6 LAURICO
6	7.432	BB	0.0522	41.41032	2.33388	7 TRIDECANOICO
7	9.741	BB	0.0551	85.28288	4.80654	8 MIRISTICO
8	10.624	BB	0.0540	39.90739	2.24918	9 MIRISTOLEICO
9	12.143	BB	0.0576	42.94267	2.42025	10 PENTADECANOICO
10	13.039	BB	0.0591	42.25145	2.38129	11 PENTADECENOICO

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
11	14.558	BB	0.0595	132.78828	7.48394	12 PALMITICO
12	15.156	BB	0.0595	43.05511	2.42658	13 PALMITOLEICO
13	16.917	BB	0.0547	41.32227	2.32892	14 HEPTADECANOICO
14	17.506	BB	0.0586	43.44114	2.44834	15 HEPTADECENOICO
15	19.220	BB	0.0598	90.03535	5.07439	16 ESTEARICO
16	19.647	BB	0.0759	132.12297	7.44645	17+18 OLEICO
17	20.671	BV	0.0621	38.43248	2.16605	20 LINOLEICO
18	20.782	VB	0.0544	37.66132	2.12259	19 LINOLELAIDICO
19	21.348	BB	0.0565	29.24085	1.64801	22 GAMMA LINOLENICO
20	22.094	BB	0.0596	32.16273	1.81269	24 LINOLENICO
21	23.587	BB	0.0547	92.54536	5.21585	21 ARAQUIDICO
22	23.985	BB	0.0554	44.46947	2.50630	23 EICOSENOICO
23	24.985	BB	0.0575	36.76343	2.07199	26 EICOSADIENOICO
24	25.543	BV	0.0544	30.01999	1.69193	30 EICOSATRIENOICO
25	25.651	VB	0.0544	47.20422	2.66043	28 EICOSATRIENOICO
26	26.013	BB	0.0562	24.94883	1.40612	25 ENEICOSANOICO
27	26.334	BB	0.0608	27.37042	1.54260	27 BEHENICO
28	27.354	BB	0.0495	21.10055	1.18923	35 EICOSAPENTANOICO
29	27.651	BB	0.0608	92.52580	5.21475	29 ERUCICO
30	28.055	BB	0.0520	47.39371	2.67111	33 DOCOSADIENOICO
31	29.018	BB	0.0541	35.13118	1.97999	32 TRICOSANOICO
32	29.580	BB	0.0557	47.39967	2.67144	34 LIGNOCERICO
33	31.571	BB	0.0603	95.29533	5.37084	37 NERVONICO
34	32.086	BB	0.0664	60.29253	3.39809	36 DOCOSAHEXAENOICO

Totals : 1774.30910

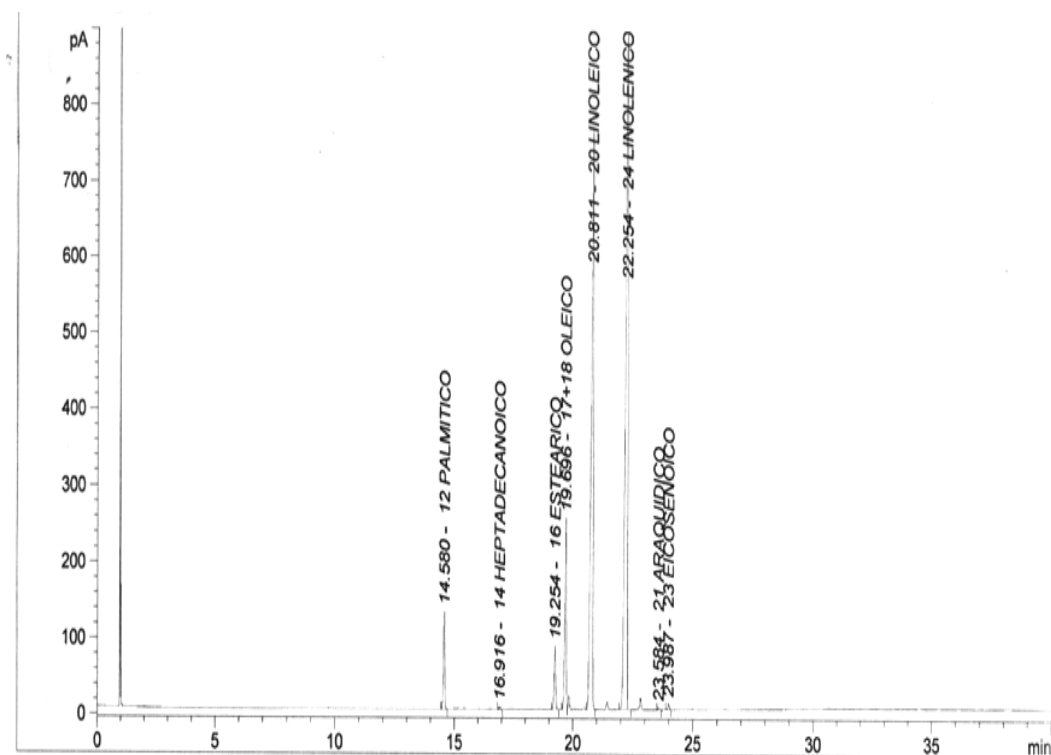
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Elution order of calibrated compounds may have changed

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Anexo N°9: Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M1**  
(Aceite "sacha inchi" sin tratar)



=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 15/08/2007 10:20:41 a.m.  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	1.236		0.0000	0.00000	0.00000	2 CAPROICO
2	1.670		0.0000	0.00000	0.00000	3 CAPRILICO
3	2.742		0.0000	0.00000	0.00000	4 CAPRICO
4	3.766		0.0000	0.00000	0.00000	5 UNDECANOICO
5	5.410		0.0000	0.00000	0.00000	6 LAURICO
6	7.426		0.0000	0.00000	0.00000	7 TRIDECANOICO
7	9.741		0.0000	0.00000	0.00000	8 MIRISTICO
8	10.618		0.0000	0.00000	0.00000	9 MIRISTOLEICO
9	12.145		0.0000	0.00000	0.00000	10 PENTADECANOICO
10	13.040		0.0000	0.00000	0.00000	11 PENTADECENOICO



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
11	14.580	BB	0.0549	515.47235	4.01416	12 PALMITICO
12	15.167		0.0000	0.00000	0.00000	13 PALMITOLEICO
13	16.916	BB	0.0529	12.03173	0.09370	14 HEPTADECANOICO
14	17.519		0.0000	0.00000	0.00000	15 HEPTADECENOICO
15	19.254	BB	0.0705	390.35321	3.03981	16 ESTEARICO
16	19.696	BV	0.0622	1122.40210	8.74053	17+18 OLEICO
17	20.699		0.0000	0.00000	0.00000	19 LINOLELAIDICO
18	20.811	VV	0.0779	4567.71973	35.57038	20 LINOLEICO
19	21.374		0.0000	0.00000	0.00000	22 GAMMA LINOLENICO
20	22.254	BB	0.0861	6185.04199	48.16502	24 LINOLENICO
21	23.584	BB	0.0548	11.32053	0.08816	21 ARAQUIDICO
22	23.987	BB	0.0653	37.01509	0.28825	23 EICOSENOICO
23	25.030		0.0000	0.00000	0.00000	26 EICOSADIENOICO
24	25.591		0.0000	0.00000	0.00000	28 EICOSATRIENOICO
25	25.700		0.0000	0.00000	0.00000	30 EICOSATRIENOICO
26	26.057		0.0000	0.00000	0.00000	25 ENEICOSANOICO
27	26.374		0.0000	0.00000	0.00000	27 BEHENICO
28	27.400		0.0000	0.00000	0.00000	35 EICOSAPENTANOICO
29	27.707		0.0000	0.00000	0.00000	29 ERUCICO
30	28.114		0.0000	0.00000	0.00000	33 DOCOSADIENOICO
31	29.072		0.0000	0.00000	0.00000	32 TRICOSANOICO
32	29.637		0.0000	0.00000	0.00000	34 LIGNOCERICO
33	31.659		0.0000	0.00000	0.00000	37 NERVONICO
34	32.160		0.0000	0.00000	0.00000	36 DOCOSAHEXAENOICO

Totals : 1.28414e4

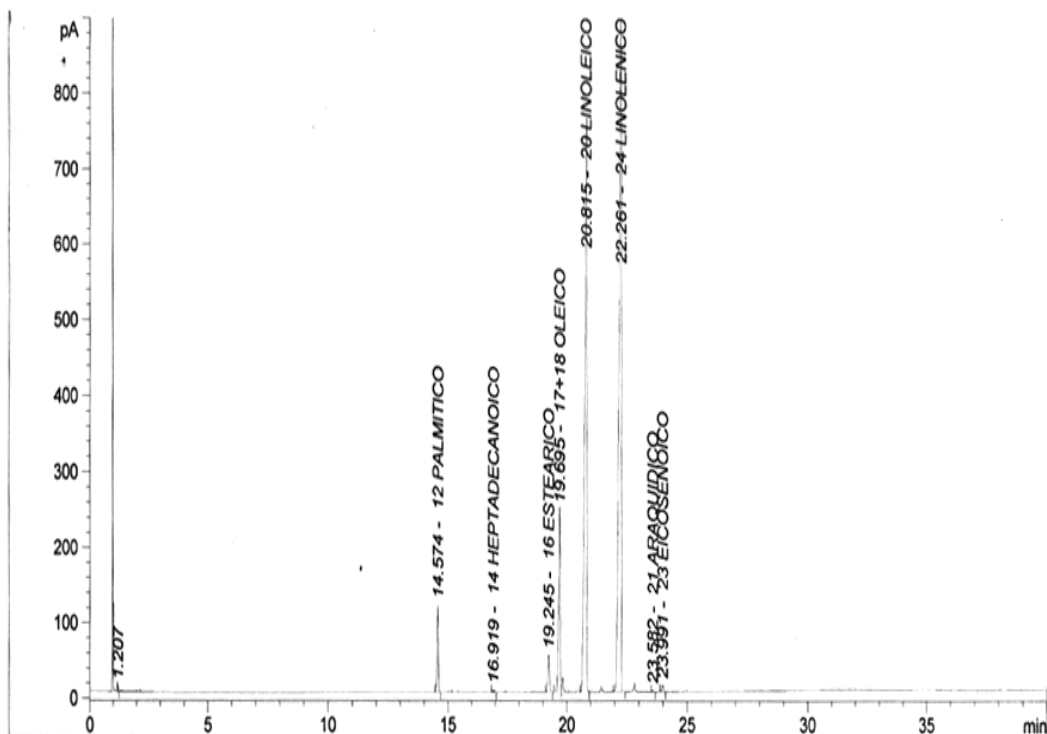
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Anexo N°10: Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M2**  
(Mezcla de ácidos grasos)



=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 15/08/2007 10:20:41 a.m.  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime (min)	Type	Width (min)	Area [pA*s]	Area %	Name
1	1.207	BB	0.0142	6.20510	0.04756	?
2	1.236		0.0000	0.00000	0.00000	2 CAPROICO
3	1.670		0.0000	0.00000	0.00000	3 CAPRILICO
4	2.742		0.0000	0.00000	0.00000	4 CAPRICO
5	3.766		0.0000	0.00000	0.00000	5 UNDECANOICO
6	5.410		0.0000	0.00000	0.00000	6 LAURICO
7	7.426		0.0000	0.00000	0.00000	7 TRIDECANOICO
8	9.741		0.0000	0.00000	0.00000	8 MIRISTICO
9	10.618		0.0000	0.00000	0.00000	9 MIRISTOLEICO
10	12.145		0.0000	0.00000	0.00000	10 PENTADECANOICO

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
11	13.040		0.0000	0.00000	0.00000	11 PENTADECENOICO
12	14.574	BB	0.0609	453.97000	3.47964	12 PALMITICO
13	15.167		0.0000	0.00000	0.00000	13 PALMITOLEICO
14	16.919	BB	0.0628	9.59003	0.07351	14 HEPTADECANOICO
15	17.519		0.0000	0.00000	0.00000	15 HEPTADECENOICO
16	19.245	BB	0.0630	231.77202	1.77651	16 ESTEARICO
17	19.695	BV	0.0650	1116.51550	8.55800	17+18 OLEICO
18	20.699		0.0000	0.00000	0.00000	19 LINOLELAIDICO
19	20.815	VV	0.0795	4696.01416	35.99455	20 LINOLEICO
20	21.374		0.0000	0.00000	0.00000	22 GAMMA LINOLENICO
21	22.261	BB	0.0821	6488.91992	49.73703	24 LINOLENICO
22	23.582	BB	0.0574	8.02206	0.06149	21 ARAQUIDICO
23	23.991	BB	0.0635	35.44843	0.27171	23 EICOSENOICO
24	25.030		0.0000	0.00000	0.00000	26 EICOSADIENOICO
25	25.591		0.0000	0.00000	0.00000	28 EICOSATRIENOICO
26	25.700		0.0000	0.00000	0.00000	30 EICOSATRIENOICO
27	26.057		0.0000	0.00000	0.00000	25 ENEICOSANOICO
28	26.374		0.0000	0.00000	0.00000	27 BEHENICO
29	27.400		0.0000	0.00000	0.00000	35 EICOSAPENTANOICO
30	27.707		0.0000	0.00000	0.00000	29 ERUCICO
31	28.114		0.0000	0.00000	0.00000	33 DOCOSADIENOICO
32	29.072		0.0000	0.00000	0.00000	32 TRICOSANOICO
33	29.637		0.0000	0.00000	0.00000	34 LIGNOCERICO
34	31.659		0.0000	0.00000	0.00000	37 NERVONICO
35	32.160		0.0000	0.00000	0.00000	36 DOCOSAHEXAENOICO

Totals : 1.30465e4

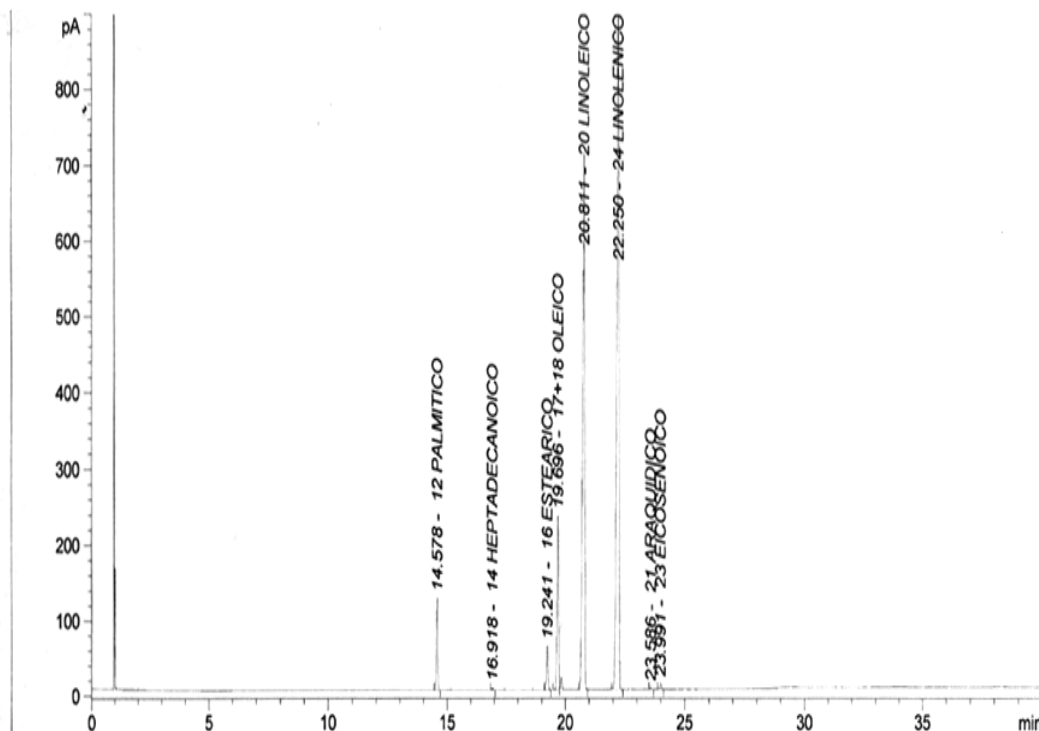
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Anexo N°11: Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M3**  
(Precipitado de los ácidos grasos)



=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 15/08/2007 10:20:41 a.m.  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	1.236		0.0000	0.00000	0.00000	2 CAPROICO
2	1.670		0.0000	0.00000	0.00000	3 CAPRILICO
3	2.742		0.0000	0.00000	0.00000	4 CAPRICO
4	3.766		0.0000	0.00000	0.00000	5 UNDECANOICO
5	5.410		0.0000	0.00000	0.00000	6 LAURICO
6	7.426		0.0000	0.00000	0.00000	7 TRIDECANOICO
7	9.741		0.0000	0.00000	0.00000	8 MIRISTICO
8	10.618		0.0000	0.00000	0.00000	9 MIRISTOLEICO
9	12.145		0.0000	0.00000	0.00000	10 PENTADECANOICO
10	13.040		0.0000	0.00000	0.00000	11 PENTADECENOICO

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
11	14.578	BB	0.0548	491.73309	4.05877	12 PALMITICO
12	15.167		0.0000	0.00000	0.00000	13 PALMITOLEICO
13	16.918	BB	0.0536	10.77330	0.08892	14 HEPTADECANOICO
14	17.519		0.0000	0.00000	0.00000	15 HEPTADECENOICO
15	19.241	BB	0.0582	271.52988	2.24121	16 ESTEARICO
16	19.696	BV	0.0626	1042.91699	8.60824	17+18 OLEICO
17	20.699		0.0000	0.00000	0.00000	19 LINOLELAIDICO
18	20.811	BV	0.0771	4323.09766	35.68286	20 LINOLEICO
19	21.374		0.0000	0.00000	0.00000	22 GAMMA LINOLENICO
20	22.250	BB	0.0860	5930.81836	48.95299	24 LINOLENICO
21	23.586	BB	0.0602	9.34373	0.07712	21 ARAQUIDICO
22	23.991	BB	0.0679	35.12045	0.28988	23 EICOSENOICO
23	25.030		0.0000	0.00000	0.00000	26 EICOSADIENOICO
24	25.591		0.0000	0.00000	0.00000	28 EICOSATRIENOICO
25	25.700		0.0000	0.00000	0.00000	30 EICOSATRIENOICO
26	26.057		0.0000	0.00000	0.00000	25 ENEICOSANOICO
27	26.374		0.0000	0.00000	0.00000	27 BEHENICO
28	27.400		0.0000	0.00000	0.00000	35 EICOSAPENTANOICO
29	27.707		0.0000	0.00000	0.00000	29 ERUCICO
30	28.114		0.0000	0.00000	0.00000	33 DOCOSADIENOICO
31	29.072		0.0000	0.00000	0.00000	32 TRICOSANOICO
32	29.637		0.0000	0.00000	0.00000	34 LIGNOCERICO
33	31.659		0.0000	0.00000	0.00000	37 NERVONICO
34	32.160		0.0000	0.00000	0.00000	36 DOCOSAHEXAENOICO

Totals : 1.21153e4

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Anexo N°12** Cromatograma y perfil de los ácidos grasos M4  
(Filtrado de los ácidos grasos)



Area Percent Report

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 15/08/2007 10:20:41 a.m.  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	1.236		0.0000	0.00000	0.00000	2 CAPROICO
2	1.670		0.0000	0.00000	0.00000	3 CAPRILICO
3	2.742		0.0000	0.00000	0.00000	4 CAPRICO
4	3.766		0.0000	0.00000	0.00000	5 UNDECANOICO
5	5.410		0.0000	0.00000	0.00000	6 LAURICO
6	7.426		0.0000	0.00000	0.00000	7 TRIDECANOICO
7	9.741		0.0000	0.00000	0.00000	8 MIRISTICO
8	10.618		0.0000	0.00000	0.00000	9 MIRISTOLEICO
9	12.145		0.0000	0.00000	0.00000	10 PENTADECANOICO
10	13.040		0.0000	0.00000	0.00000	11 PENTADECENOICO

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
11	14.565	BB	0.0618	292.09299	2.30214	12 PALMITICO
12	15.167		0.0000	0.00000	0.00000	13 PALMITOLEICO
13	16.934		0.0000	0.00000	0.00000	14 HEPTADECANOICO
14	17.519		0.0000	0.00000	0.00000	15 HEPTADECENOICO
15	19.237	BB	0.0580	81.95162	0.64590	16 ESTEARICO
16	19.693	BV	0.0631	1108.08203	8.73339	17+18 OLEICO
17	20.699		0.0000	0.00000	0.00000	19 LINOLELAIDICO
18	20.811	BV	0.0758	4777.87549	37.65699	20 LINOLEICO
19	21.374		0.0000	0.00000	0.00000	22 GAMMA LINOLENICO
20	22.259	BB	0.0836	6394.01514	50.39465	24 LINOLENICO
21	23.623		0.0000	0.00000	0.00000	21 ARAQUIDICO
22	23.994	BB	0.0593	33.86829	0.26693	23 EICOSENOICO
23	25.030		0.0000	0.00000	0.00000	26 EICOSADIENOICO
24	25.591		0.0000	0.00000	0.00000	28 EICOSATRIENOICO
25	25.700		0.0000	0.00000	0.00000	30 EICOSATRIENOICO
26	26.057		0.0000	0.00000	0.00000	25 ENEICOSANOICO
27	26.374		0.0000	0.00000	0.00000	27 BEHENICO
28	27.400		0.0000	0.00000	0.00000	35 EICOSAPENTANOICO
29	27.707		0.0000	0.00000	0.00000	29 ERUCICO
30	28.114		0.0000	0.00000	0.00000	33 DOCOSADIENOICO
31	29.072		0.0000	0.00000	0.00000	32 TRICOSANOICO
32	29.637		0.0000	0.00000	0.00000	34 LIGNOCERICO
33	31.659		0.0000	0.00000	0.00000	37 NERVONICO
34	32.160		0.0000	0.00000	0.00000	36 DOCOSAHEXAENOICO

Totals : 1.26879e4

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

\*\*\* End of Report \*\*\*